



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAETRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

DETECCIÓN Y SECUENCIACIÓN DEL DELTACORONAVIRUS PORCINO EN MÉXICO

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR LE GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

CLAUDIA MARIANA PÉREZ RIVERA

TUTOR PRINCIPAL:

José Ivan Sánchez Betancourt (FMVZ-UNAM)

COMITÉ TUTORAL:

Susana Mendoza Elvira (FESC-UNAM)

Humberto Ramírez Mendoza (FMVZ-UNAM)

Ciudad Universitaria, CDMX abril 2020.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIA

A mi esposo Ayin Alvarado, por vivir esta vida conmigo, por luchar por nuestro amor y no rendirte. Gracias por el apoyo que me brindas, por motivarme a querer ser mejor cada día y por tu amor. A mi motor Kaina, tu amor tan puro me llena de energía.

A mis padres, Nancy Rivera Ortiz y Mario Alberto Pérez Hernández, por siempre darme todo por mí, por educarme, por cuidarme y siempre buscar lo mejor para nuestra familia. A mi hermano Héctor Alberto Pérez, un gran ejemplo y apoyo en mi vida. Por todo su cariño.

A mis abuelos, Teresa Ortiz, Juan Rivera†, Teresa Hernández y Fernando Medina por ser el lazo que nos une, por su cariño tan sólido. A familia entera, porque cada uno representa un pilar en mi vida.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia por ser parte esencial de mi formación profesional, por darme las herramientas necesarias y a los profesores más capacitados. Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada. Al proyecto de ciencia básica CONACYT CB-2015-254244.

Toda mi gratitud al Dr. José Iván Sánchez Betancourt por ser un gran guía y mentor desde hace más de 10 años, porque además de formarme profesionalmente siempre conté con su soporte y comprensión en lo personal. Al Dr. Humberto Ramírez Mendoza por compartirme sus conocimientos, por alentarme a buscar una manera diferente de hacer las cosas y a no darme por vencida. Y a la Dra. Susana Mendoza Elvira, por su apoyo en el proyecto, su orientación, comentarios y por siempre estar.

Al Dr. René Segura Velázquez y a la Unidad de Investigación de la FMVZ por las facilidades brindadas para la realización de las pruebas moleculares y por la orientación en la obtención de resultados y su amistad.

A mis sinodales, la Dra. Rosa Elena Sarmiento, Dr. Luis Padilla Noriega y Dr. Armando Pérez Torres por su apoyo en la revisión de mi trabajo y por sus comentarios.

A mis amigos del laboratorio Saúl Reveles y Mari Jo Contreras por el apoyo brindado, por su ayuda, por sus consejos, por su cariño y apoyo en todo momento. A Amaranta Vázquez y a Selene Quintana por permitirme ser parte de su aprendizaje, por su cariño y amistad. A mis compañeros del grupo de investigación, especialmente a Manuel Saavedra por su apoyo en el análisis filogenético y a Mariana García Plata por el apoyo en el análisis de la proteína.

Al laboratorio de investigación del DPAC de la FMVZ por las facilidades brindadas para llevar a cabo parte de mi trabajo experimental.

CONTENIDO

Resumen	6
Summary	7
1. Introducción	8
2. Antecedentes	10
2.1 Coronavirus. Características generales	11
2.2 Replicación de los coronavirus	12
2.3 Proteína S	14
2.4 Deltacoronavirus	14
2.5 Variabilidad de PDCoV	17
2.6 Epidemiología	17
2.7 Diagnóstico y control	18
3. Justificación	21
4. Hipótesis	22
5. Objetivo general	23
5.1 Objetivos particulares	23
6. Materiales y métodos	24
6.1 Obtención y almacenamiento de muestras	24
6.2 Purificación de RNA	24
6.3 Estandarización de RT PCR punto final	24
6.4 RT PCR tiempo real	26
6.5 Aislamiento viral	26
6.5.1 Preparación del inóculo	26
6.5.2 Estandarización del protocolo de inoculación	27
6.5.2.1 Uso de tripsina en el medio	28
6.6 Amplificación del gen S para secuenciación	29

6.7	Análisis de las secuencias	30
6.7.1	Determinación del porcentaje de identidad de las secuencias	30
6.7.2	Alineamiento múltiple	30
6.7.3	Construcción del árbol filogenético	31
7.	Resultados	31
7.1	Resultados de estandarización de RT PCR punto final.....	31
7.2	Resultados de RT PCR tiempo real	33
7.3	Resultados de aislamiento viral en cultivo celular	34
7.4	Resultado de la amplificación del gen S	35
7.5	Porcentaje de identidad de las secuencias	37
7.6	Construcción del árbol filogenético	37
7.7	Análisis de las secuencias	39
8.	Discusión.....	43
9.	Conclusiones	45
10.	Referencias bibliográficas	46
	Anexos	52

Resumen

El deltacoronavirus porcino ha causado grandes pérdidas económicas en la industria porcina alrededor del mundo desde la primera asociación a un cuadro clínico. En este trabajo, se realizó la primer detección, aislamiento, secuenciación y caracterización del deltacoronavirus porcino en México. Para ello, se analizaron 885 muestras de hisopos rectales por medio de la técnica de RT PCR para determinar la presencia del virus, así como coinfecciones. Además, el gen Spike, fue amplificado, secuenciado y analizado filogenéticamente. Encontramos 85 muestras positivas a deltacoronavirus, lo cual representa el 9.6% del total de las muestras, y se determinó que la coinfección más frecuente fue con el virus de la diarrea epidémica porcina (54.1%). Las secuencias obtenidas en este estudio, mostraron estar relacionadas con las de los Estados Unidos de América, las regiones antigénicas y los sitios de glicosilación de las secuencias mexicanas coinciden con las que se han reportados previamente. Esta relación puede estar asociada al intercambio comercial y a la cercanía de los dos países.

Palabras clave: Deltacoronavirus porcino, México, análisis filogenético, prevalencia, gen spike.

Summary

Porcine deltacoronavirus has caused great economic losses in the swine industry worldwide. In this study, we carried out the first detection, sequencing and characterization of this virus in Mexico. We analyzed 885 rectal samples by multiplex RT-PCR to determine coinfections. In addition, the Spike gene was amplified, sequenced and analyzed phylogenetically. We found 85 positive samples for porcine deltacoronavirus, representing 9.6% of the total samples, and we determined that the most frequent coinfection was with porcine epidemic diarrhea virus (54.1%). Four sequences of Mexican isolates were most closely related to those of the United States. The antigenic regions and the glycosylation site of the strains obtained coincide with those previously reported. This relationship is probably related to the commercial exchange of pigs between the US and Mexico and the geographical proximity of both countries.

Keywords: Porcine deltacoronavirus, Mexico, phylogenetic analysis, prevalence, spike gene.

1. Introducción

Los coronavirus son virus que se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza y afectan a una gran variedad de hospederos en los que causan cuadros tan variados, como respiratorios, digestivos e incluso neurológicos; en los humanos son los causantes de un cuadro respiratorio común hasta el síndrome respiratorio agudo severo (SARS por sus siglas en inglés) y el MERS (síndrome respiratorio de oriente medio) que han impactado la salud pública en la última década (Huang et al., 2013; Woo et al., 2012).

La subfamilia *Orthocoronavirinae* de la familia *Coronaviridae*, que pertenece al orden de los Nidovirales, se encuentra dividida en 4 géneros, *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gammacoronavirus* y *Deltacoronavirus*. Cada uno de ellos afecta a varias especies de mamíferos voladores, terrestres e incluso acuáticos y aves (Wang, Byrum, & Zhang, 2014). Dentro de los *Deltacoronavirus* existen 4 subgéneros.

En los cerdos se sabe de cinco principales coronavirus que provocan enfermedad, éstos pertenecen a tres de los cuatro géneros conocidos. Dentro de los *Alphacoronavirus* se encuentran el virus de la Gastroenteritis Transmisible (GETv), el virus de la Diarrea Epidémica Porcina (DEPv) y el coronavirus respiratorio porcino (PRCv); en los *Betacoronavirus* está el virus de la encefalomiелitis hemoaglutinante porcina (PHEv) y finalmente al género de los Deltacoronavirus pertenece el recién descrito deltacoronavirus porcino (PDCoV) (Chen et al., 2015). Los dos primeros géneros tienen su origen en los murciélagos, mientras que el tercer y cuarto género lo tienen en las aves (Woo et al., 2012).

Los deltacoronavirus porcinos han sido descritos recientemente, primero como un hallazgo durante un trabajo epidemiológico realizado en China entre 2007 y 2011, para la detección de coronavirus en diferentes especies, pero sin ser asociados a un cuadro clínico (Woo et al., 2012). Fue hasta el 2014 que se asoció el

deltacoronavirus a un cuadro clínico entérico en cerdos, debido al monitoreo epidemiológico derivado del impacto que tuvo la presencia del virus de la diarrea epidémica porcina tuvo en los Estados Unidos (Marthaler, Raymond, et al., 2014; Wang et al., 2014). Las altas tasas de mortalidad, principalmente en lechones, suscitadas en el año 2013 en los EEUU, llevó a centrar los esfuerzos del gremio de poricultores e investigadores en conocer el o los causantes de las enormes pérdidas económicas. Rápidamente, se supo que no era un solo virus el circulante, sino que había al menos 2 coronavirus entéricos involucrados, PEDv y PDCoV.

Definitivamente, debido al enorme impacto que PEDv provocó, las investigaciones se centraron en su estudio, sin embargo, PDCoV también es causal de altas tasas de mortalidad y morbilidad, pero sin lugar a dudas, su estudio no ha sido tan exhaustivo. A pesar de esto, hoy se conocen casi un centenar de secuencias completas del genoma de éste virus proveniente de al menos 7 países distintos (Lao, Tailandia, Japón, Corea del Sur, Vietnam, China y Estados Unidos). Ya se cuenta con una patente registrada para una vacuna divalente frente a PEDv y PDCoV por la compañía Zoetis© (WO 2016/007576, PCT/US/039475).

En nuestro país, hasta el momento no existe información oficial por parte de las autoridades en materia de sanidad animal, sobre la presencia de PDCoV, a pesar del impacto que la enfermedad ha tenido en varios países productores de cerdos. Por ello, se planteó como objetivo de este trabajo identificar la presencia de PDCoV en México y analizar la secuencia genómica del gen S (Spike) a partir de aislamientos virales, debido al papel que la proteína S juega en el ciclo replicativo del virus, la determinación del rango de hospederos y tropismo, principalmente. Con la información generada sobre su secuencia, filogenia y estructura, podremos analizar y entender al menos una parte de su virulencia, inmunogenicidad y epidemiología.

2. Antecedentes

2. 1 Coronavirus. Características generales

Los coronavirus son únicos dentro de los virus ARN, debido a que su genoma es particularmente grande (~27.5 a ~31 kb). Estos virus con envoltura, de una sola cadena en sentido 5´- 3´ y con una nucleocápside helicoidal, contienen al menos 7 marcos abiertos de lectura (ORF, siglas en inglés), que codifican para 4 proteínas estructurales (Tabla 1); y 2 proteínas no estructurales (1ab y ORF3). El ORF1ab abarca dos terceras partes del genoma y codifica para la poliproteína replicasa. El gen ORF3, es un gen accesorio que codifica para proteínas accesorias, sin embargo éste no se encuentra en el genoma de deltacoronavirus (Daesub Song & Park, 2012).

Morfológicamente, los coronavirus son virus envueltos, esféricos o pleomórficos, con un diámetro medio que va de 80 a 120 nm, sus espículas características en la superficie que le dan una apariencia de “corona” o “sol”, son las responsables del nombre de esta familia de virus. Además de las espículas, en la envoltura del virus se observan otras dos estructuras proteicas, la membrana (M), que es muy abundante y le da la forma al virión, y en contraste la pequeña proteína E. Dentro de la envoltura encontramos la proteína de la nucleocápside unida al ARN genómico en forma helicoidal (Masters, 2006; S. G. Sawicki, Sawicki, & Siddell, 2007) (Imagen 1).

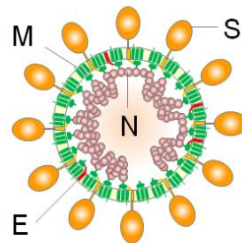


Imagen 1. Diagrama de la ubicación de las proteínas estructurales de los coronavirus. Tomado de Ujike M y Taguchi F. Viruses 2015, 7, 1700-1725; doi:10.3390/v7041700

Tabla 1. Proteínas estructurales de los coronavirus.

Gen	Tamaño (pb)	Función
S	~3.5 Kb	Es una glicoproteína, compuesta por poco más de 1,300 aminoácidos y es un antígeno de superficie. Media la entrada del virus e induce la producción de anticuerpos neutralizantes en el hospedero.
E	252	Cuando hay coexpresión con la proteína M, se forman pseudopartículas que muestran una actividad parecida a la de viriones completos.
M	654	Es el componente más abundante en la membrana viral. Juega un papel importante en el ensamblaje viral, promueve la producción de anticuerpos neutralizantes y posiblemente induce al interferón alfa.
N	1029	Es una fosfoproteína, que es la base para la cápside del virus. Se une al ARN del virión y se puede usar como molécula diana en el diagnóstico específico de esta enfermedad.

Adaptado de Song D y Park, B Virus Genes (2012) 44:167–175; DOI 10.1007/s11262-012-0713-1

2.2 Replicación de los coronavirus

El virus para ingresar a la célula blanco, que en el caso de PDCoV, son los enterocitos, primero debe unirse al receptor de la superficie celular que se cree es Aminopeptidasa N (APN). La glicoproteína “Spike” o S es quien media la unión del virus al receptor que se fragmenta en dos subunidades funcionales por la acción de las proteasas del hospedero. La subunidad 1 (S1) es la responsable de la unión al receptor y el principal determinante del tropismo del virus, mientras que la S2 es la responsable de la fusión de membranas. Ésta última es activada tras la unión de la S1 al receptor (Fung & Liu, 2014).

La entrada de virus en la célula huésped puede ocurrir mediante la fusión de membranas y la subsiguiente liberación del ARN genómico en el citoplasma. Alternativamente puede entrar en la célula huésped a través de la formación de vesículas endocíticas, y el ARN genómico se libera en el citoplasma después de la fusión de la membrana con la vesícula (Stanley G Sawicki, 2009). Una vez que el ARN genómico (+) se encuentra desnudo en el citoplasma, se lleva a cabo la traducción de éste, sirviendo como un ARN mensajero para dar lugar a la poliproteína 1ab (replicasa). El ORF 1, responsable de la traducción de esta poliproteína, se divide en 2 grandes ORFS, 1a y 1b, el final del primero se solapa con el principio del segundo y dan lugar a esta importante proteína que después es procesada por la cisteína proteasa tipo papaína produciendo NSP (proteínas no estructurales, por sus siglas en inglés), que aún no se conocen claramente sus funciones, sin embargo, se cree que tienen actividad enzimática como: proteinasas, helicasas e incluso ARN polimerasa dependiente de ARN (Fung & Liu, 2014; Stanley G Sawicki, 2009).

La replicación de los coronavirus ocurre en el citoplasma, ahí la replicasa toma como molde el ARN genómico (+) y sintetiza ARN genómico sentido negativo, que a su vez será utilizado como plantilla para sintetizar progenie de ARN genómico sentido positivo. Por otro lado, también se sintetizarán ARN's subgenómicos (sgARN) a través de una transcripción discontinua del genoma viral. Por ello se habla de la formación de un complejo replicasa/transcriptasa (RTC). Cada sgARN comparte la terminación 3' y 5' con el ARN genómico. Sin embargo, cada uno cuenta con un codón de inicio único que permite la traducción de una proteína estructural o accesoria determinada. Las proteínas estructurales (S, M y E) se sintetizan y se pliegan en el retículo endoplásmico (RE) para ser transportadas al compartimiento intermedio RE y Aparato de Golgi (ERGIC). Las proteínas N se traducen en el citoplasma y encapsidan la progenie naciente del ARN genómico para formar nucleocápsidos. El montaje del virión ocurre en el

ERGIC (Imagen 2), y es probable que sea orquestado por la proteína M a través de una interacción proteína-proteína (Fung & Liu, 2014).

Los viriones se exportan a través de la vía secretora en vesículas de paredes lisas, que finalmente se fusionan con la membrana plasmática y liberan las partículas virales maduras. En algunos coronavirus, una porción de la proteína S escapa de la unión viral y es secretada a la membrana plasmática. Estas proteínas causan la fusión de la célula infectada con las células vecinas no infectadas, dando lugar a la formación de una célula multinucleada grande conocida como sincitio, que permite al virus propagarse sin ser liberado al espacio extracelular (Masters, 2006).

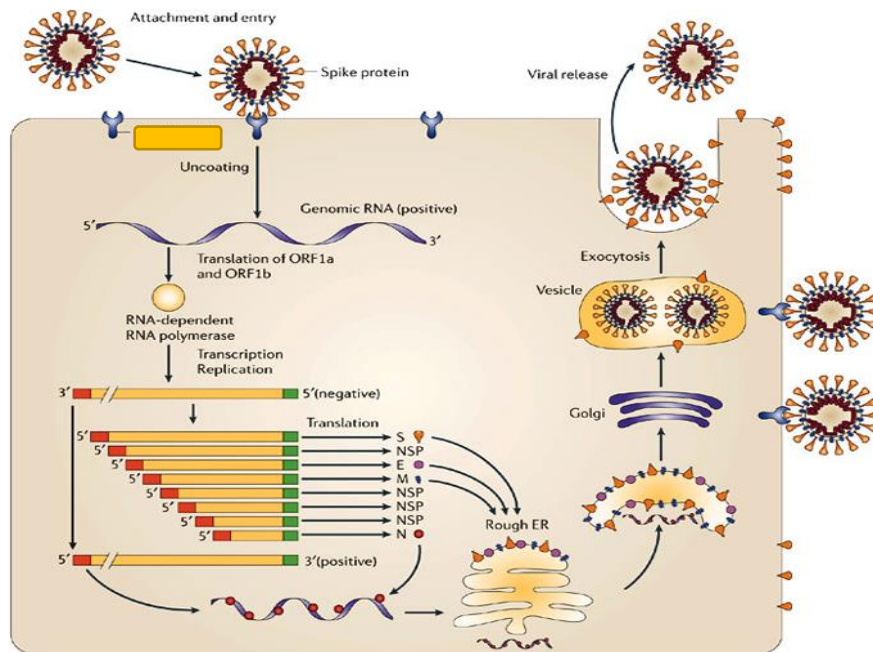


Imagen 2. Ciclo replicativo de los deltacoronavirus. Cornelia C. Bergmann, et al. (2006) Coronavirus infection of the central nervous system: host-virus stand-off. Nature Reviews Microbiology. 4, 121-132.

2.3 Proteína S

La proteína S se encuentra en la superficie del virión en forma de picos triméricos. es la estructura más estudiada debido al papel determinante que juega en la patogénesis y virulencia(Ujike & Taguchi, 2015). En promedio, está conformada de 1300 aminoácidos, sin embargo, la proteína Spike de los deltacoronavirus es la más pequeña de la familia *Coronaviridae* esta proteína está altamente glicosilada, contiene entre 21 y 35 sitios potenciales de N-glicosilación y se escinde en los dominios S1 y S2 por proteasas hospedero o exógenas. El dominio S1 contiene un dominio de unión para un receptor de la célula huésped y al formar trímeros toma la forma globular característica que vemos en la superficie del virión, mientras que el dominio S2, comprende el tallo de la proteína y es responsable de la entrada viral y la fusión celular (Bosch, 2004; Fehr & Perlman, 2015).

La proteína spike es un determinante crítico en el rango de hospederos blanco, tropismo tisular y en la inducción de la respuesta inmune, por ello cuenta con características que facilitan la evasión del sistema de defensa como: tener una estructura compacta con lo que disminuye la superficie de contacto, los sitios de unión al receptor están ocultos y sus epítomos protegidos por glicosilaciones (Shang et al., 2018). La fracción S1 de la proteína spike de deltacoronavirus contiene galectina, gracias a esto reconoce los azúcares como receptores, facilitando su unión a las células, a pesar de conocer esto, aún no está definido cuál es el receptor específico para los deltacoronavirus (Shang et al., 2018).

2.4 Deltacoronavirus.

PDCoV pertenece al recién clasificado subgénero *Buldecovirus* del género *Deltacoronavirus* (ICTV, 2018). La subfamilia se divide en 4 géneros, *alphacoronavirus*, *betacoronavirus*, *gammacoronavirus* y *deltacoronavirus*.

El Deltacoronavirus porcino (PDCoV) fue detectado por primera vez en Hong Kong a partir de muestras colectadas entre 2009 y 2010, en ese estudio el objetivo fue determinar la variabilidad de coronavirus de murciélagos de China, derivado de la relevancia que la familia *Coronaviridae* en dicho país desde la presentación de enfermedades respiratorias agudas en humanos. En ese trabajo analizaron muestras de cerdos que no presentaban un cuadro clínico aparente, sin embargo PDCoV fue detectado (Woo et al., 2012).

Posteriormente, a principios del 2014 se registró PDCoV en los Estados Unidos de América (EEUU) y Canadá, pero esta vez causando fuertes pérdidas económicas a la industria porcina por la presentación de un cuadro clínico entérico (Chen et al., 2015; Ma et al., 2015). La signología descrita era muy parecida al provocado por DEPV (virus de la Diarrea Epidémica Porcina), es decir, diarrea acuosa, vómito, deshidratación y muerte en cerdos jóvenes. Sin embargo, en los primeros reportes en EEUU mencionan que la mortalidad en lechones fue menor (30-40%) a la normalmente observada en brotes de DEP en Asia (Marthaler, Raymond, et al., 2014; Wang et al., 2014). Estudios experimentales hechos en lechones muestran que los signos más frecuentes causados por la enfermedad son la diarrea acuosa, vómito y deshidratación (Ma et al., 2015). Autores señalan que las infecciones por PDCoV son comunes en cerdos de la región noroeste de los EUA y que las coinfecciones son frecuentes, sobre todo con los Rotavirus C (Liu et al., 2018; Ma et al., 2015; Marthaler, Raymond, et al., 2014).

Con el fin de entender mejor el origen de deltacoronavirus en cerdos, se han realizado diversos estudios retrospectivos uno de ellos hecho en China (Dong et al., 2015) con muestras de lechones con cuadro clínico diarreico, del 2004 al 2012, donde se observó un porcentaje de animales positivos a PDCoV de 6.5%, detectando al antígeno. Otro estudio similar fue realizado en los EEUU, pero en este caso fue a través de la detección de anticuerpos IgG frente a PDCoV, donde se detectaron animales seropositivos desde el año 2010 (Thachil, Gerber, Xiao, Huang, & Opriessnig, 2015).

Las infecciones por coronavirus suelen ser específicas de especie, sin embargo Jung K. y colaboradores han reportado la excreción fecal del virus y la presencia de anticuerpos específicos IgG en suero de becerros gnotobióticos infectados experimentalmente con PDCoV; los animales no mostraron signología alguna ni cambios histológicos. En este trabajo también se sometió a otro grupo de animales a la inoculación con PEDv, pero ninguno de los animales mostró algún cambio histológico, ni signos clínicos, así como tampoco se observó excreción o seroconversión (Jung, Hu, & Saif, 2017). Se cree que es probable que PDCoV puede infectar a otras especies animales, además de los cerdos, y que solo esté parcialmente adaptado a esta especie debido al aparente poco tiempo que lleva circulando (Jung et al., 2017).

Análisis filogenéticos sugieren que el surgimiento de deltacoronavirus en cerdos se originó por un evento de cambio de hospedero entre aves y mamíferos (Li et al., 2018). La familia *Coronaviridae* ha presentado casos importantes de transmisión interespecie, basta mencionar el evento que se tuvo con el virus causante del síndrome respiratorio de Medio Oriente (MERS, por sus siglas en inglés), donde se sabe que el virus fue transmitido de camellos a humanos y posteriormente de humanos a humanos (Chan et al., 2015). Con base en estas observaciones y aunado a la necesidad de conocer el receptor activo para deltacoronavirus porcino, se han realizado investigaciones donde se ha observado la capacidad de este virus para infectar células de diferentes especies, observando que PDCoV se une a un dominio conservado interespecie de APN, propiedad que le da la capacidad de poder ingresar a células de diferentes especies (Li et al., 2018). Se ha demostrado que APN participa como receptor de PDCoV, sin embargo, el bloqueo de este no limita la entrada del virus a las células por completo, lo que sugiere que el virus quizá utiliza otras vías de entrada independiente de APN (Zhu et al., 2018).

2.5 Variabilidad de PDCoV

En Estados Unidos y en China se han estudiado completamente las secuencias genómicas del PDCoV presente en ambos países, encontrando un porcentaje de identidad de nucleótidos mayor al 99% entre estos virus. En China se han reportado 2 variantes de PDCoV (HKU15-44 y HKU15-155), mientras que en Estados Unidos al menos 6, todas ellas mayormente relacionadas con el HKU15-155 (Marthaler, Jiang, Collins, & Rossow, 2014a). Sin embargo, el origen del PDCoV en Estados Unidos es aún desconocido. Hasta la fecha no se han reportado cepas altamente patógenas.

En un análisis de 50 genomas completos de deltacoronavirus, hecho por Zhang en 2016, concluye que las secuencias estadounidenses se agrupan con las coreanas, mientras que las de China (incluido Hong Kong) forman otro agrupamiento independiente al igual que las tailandesas de acuerdo a la identidad de nucleótidos (Zhang, 2016). Hasta la fecha están reportado 91 genomas completos de PDCoV de 7 países distintos.

2.6 Epidemiología

Desde junio de 2014 hasta noviembre de 2017, el servicio de inspección de salud de plantas y animales de Estados Unidos (APHIS, por sus siglas en inglés) informó que PED se encuentra ya en 38 estados del país, Deltacoronavirus en 17 estados y co-infecciones por PED y PDCoV en 17 estados. La prevalencia de PED es de 14.8% mientras que para el caso de PDCoV es de 2% (USDA, 2017) Así mismo, Deltacoronavirus estuvo presente en el 10% de las muestras estudiadas en China (Marthaler, Jiang, Collins, & Rossow, 2014b). Análisis filogenéticos muestran que las variantes de PDCoV encontrados en Estados Unidos tiene un ancestro común con el de China (Marthaler, Raymond, et al., 2014).

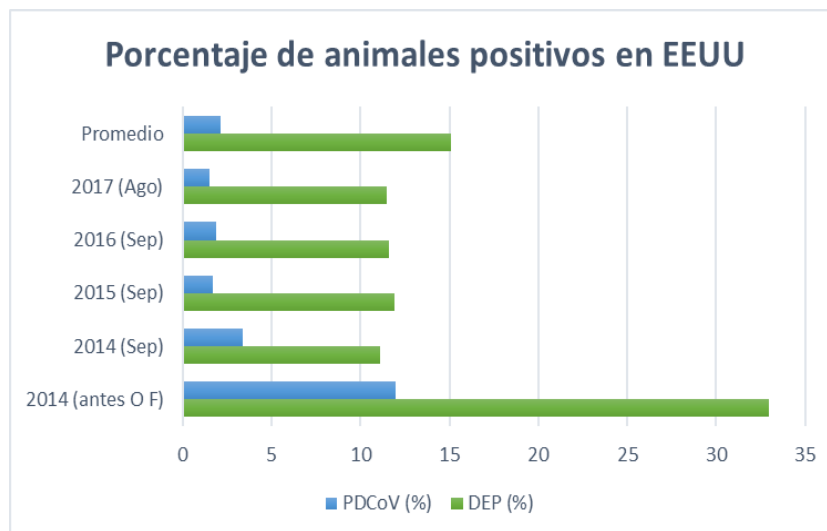


Imagen 3. Porcentaje de animales positivos a PDCoV y DEP en los Estados Unidos desde 2014 a 2017. USDA-APHIS

En un estudio hecho durante 2015, donde se analizaron muestras de Canadá, Chile, EUA y México reportan resultados positivos en los dos últimos con porcentaje de 5.2 y 4.4% respectivamente (Homwong et al., 2015)

Como en el caso de la entrada de PED a México, se deben tomar las medidas precautorias necesarias para evitar la diseminación de PDCoV al país, conocer su prevalencia, así como las variables presentes para una mejor toma de decisiones en materia sanitaria. La importación de animales hacia nuestro país es frecuente y con ello la posibilidad de entrada de agentes infecciosos pese a la toma de medidas sanitarias.

2.7 Diagnóstico y control.

Las investigaciones sobre DEP y PDCoV se centran, actualmente, en reconocer las variantes de los aislados virales presentes en cada lugar para así lograr un eficiente y efectivo diseño de vacunas. Contra DEP, en Asia y América existen ya algunas vacunas que han sido utilizadas en granjas, sin embargo, es de destacarse que no todas las cerdas llegan a desarrollar inmunidad lactogénica.

También se han creado vacunas orales, e incluso se dice que son más efectivas que las inyectables y su uso es seguro en lechones, sin embargo no alteran significativamente el tiempo de eliminación del virus (Daesub Song & Park, 2012). En la actualidad no hay vacunas ni tratamientos disponibles para PDCoV (Chen, Qi, Ganwu, Li, Thomas, Joseph, Stensland, Wendy, Pillatzki, 2015). Aunque en la página de la Organización mundial de la propiedad intelectual (WIPO, por sus siglas en inglés) ya existe la patente de una vacuna de virus inactivo frente a PDCoV y PEDv de la empresa americana Zoetis Services© (<https://patentscope.wipo.int>).

El diagnóstico de PED y PDCoV no puede ser basado en la signología clínica por su parecido a otras afecciones digestivas causadas tanto por virus, bacterias y parásitos. Por ello debe realizarse un diagnóstico clínico diferencial. Para el diagnóstico de PDCoV, han sido utilizadas una gran gama de pruebas, como la ELISA, inmunofluorescencia, inmunohistoquímica y microscopía electrónica; sin embargo, carecen de alta sensibilidad y especificidad. La técnica de RT-PCR ha sido usada exitosamente y ayuda a distinguir entre cepas de laboratorio y de campo, además, ya existen este tipo de pruebas capaces de diferenciar entre PDCoV, GET y DEP (Marthaler, Raymond, et al., 2014; Daesub Song & Park, 2012). Para las pruebas diagnósticas disponibles se pueden utilizar diferentes muestras, como alimento de granjas sospechosas, trozos de intestino de animales afectados, heces, hisopos de heces y saliva; sin embargo, el tipo de muestra del que se han obtenido mayores resultados es de muestras de intestino y de heces (Marthaler, Raymond, et al., 2014).

Las pruebas serológicas, como la ELISA, nos ayudan a detectar anticuerpos, pero es importante señalar que el hallar anticuerpos en el suero de los animales no significa que estos se encuentren protegidos de la enfermedad. Sin embargo, son un claro indicativo que el animal ha tenido contacto con el agente y para conocer el estado de infección de la piara (Thachil et al., 2015). Investigadores han señalado que determinar los niveles de IgA de calostro son un mejor indicativo del

nivel de protección de los cerdos. Las inmunoglobulinas de tipo G son las más abundantes en el calostro de las cerdas, sin embargo, las IgA son las más efectivas neutralizando patógenos, debido a que son más resistentes a la degradación proteolítica del tracto digestivo y porque poseen más propiedades neutralizantes de agentes virales que las IgG e IgM. (Daesub Song & Park, 2012).

3. Justificación

Con la llegada del virus de la diarrea epidémica porcina al continente americano y el surgimiento, aparentemente paralelo, de cepas de deltacoronavirus que generaron un enorme impacto en la porcicultura debido a que además de afectar a cerdos de todas las edades, provocaron altas tasas de mortalidad, principalmente en lechones. Ahora se sabe que las cepas americanas del DEPV se encuentran altamente relacionadas a cepas asiáticas, por ello es necesario realizar muestreos en México con el objetivo de identificar si existe la circulación de PDCoV en nuestro país y evaluar si presentan las mismas características genéticas y morfológicas de las reportadas en China y Estados Unidos. Así mismo, esta información contribuirá para la elaboración de planes de manejo y/o el establecimiento de estrategias sanitarias con vacunas comerciales que contengan las variantes encontradas. La propuesta de detección y caracterización genética de este estudio, consiste en realizar una colección de aislados virales en todo el país, con la finalidad de conocer las variantes de PDCoV que circulan en México.

4. Hipótesis

Dado que existe una alta probabilidad de la presencia de PDCoV en explotaciones porcinas de la República Mexicana, estos virus presentarán variaciones genéticas con respecto a los PDCoV encontrados en Estados Unidos y China.

5. Objetivo general

Detectar PDCoV e identificar diferencias genéticas de muestras provenientes de granjas de producción porcina de México

5.1 *Objetivos particulares*

1. Detectar por medio de RT-PCR punto final y tiempo real muestras positivas a PDCoV provenientes de regiones productoras de cerdos de la República Mexicana.
2. Determinar la frecuencia de coinfecciones entre los tres principales coronavirus en México.
3. Realizar aislamiento viral en cultivo celular de deltacoronavirus porcino.
4. Realizar la amplificación y secuenciación del gen S.
5. Identificar variaciones génicas del PDCoV de muestras de diferentes regiones productoras del país.

6. Material y Métodos

El estudio se desarrolló en el laboratorio de Investigación del Departamento de Medicina y Zootecnia de Cerdos (DMZC), en el laboratorio de Virología Molecular del Departamento de Microbiología y en la Unidad de Investigación de la Facultad de Medicina Veterinaria de la UNAM.

6.1 Obtención y almacenamiento de muestras.

Se obtuvieron 885 muestras de heces de cerdos adultos provenientes de 15 estados de la República Mexicana de los años 2015 al 2017. Las muestras colectadas fueron a través de hisopados rectales, los cuales se transportaron en refrigeración al laboratorio de Investigación del Departamento de Medicina y Zootecnia de cerdos de la FMVZ. Se les añadió 5 ml de PBS 1X y fueron centrifugadas a 5000 rpm durante 15 minutos para posteriormente obtener el sobrenadante, el cual fue almacenado a -70 °C hasta su uso.

6.2 Purificación de RNA

Se descongeló una de las alícuotas de cada muestra y se realizó la extracción de ARN por medio del kit QIAamp Viral RNA (Qiagen© Cat. 52906) siguiendo las especificaciones del fabricante, obteniendo un volumen final de 60 µL de ARN purificado.

6.3 Estandarización de RT-PCR punto final

Haciendo uso de la plataforma primer-BLAST del NCBI (National Center for Biotechnology Information) se desarrollaron iniciadores tomando como base la cepa de referencia PDCoV/USA/Illinois121/2014 (clave de acceso KJ481931) dirigidos a los genes de la membrana (M) y de las espículas (S) (Tabla 2). Todas las secuencias de iniciadores se alinearon frente a las secuencias disponibles en

el GenBank y se verificó así su especificidad. Posteriormente se mandaron a sintetizar a la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

Tabla 2. Iniciadores utilizados para la PCR punto final.

GEN	NOMBRE DEL PRIMER	SENTIDO	SECUENCIA (5' - 3')	TEMPERATURA DE ALINEAMIENTO	TAMAÑO DEL AMPLICÓN
S	S Comp	F	CAGAATGCAGAGAGCTCTAT	54	3734
		R	CGTCAGACATAGTGAGTGTT		
M	M Comp	F	CAAGAACCACGAGACTGTAA	56	793
		R	CACTATGTCTGACGCAGAAG		

La reacción en cadena de la polimerasa punto final para el gen M, se realizó con el kit OneStep de QIAGEN® (Qiagen OneStep RT-PCR kit Cat. 210212), siguiendo las especificaciones del fabricante, pero con la optimización de los reactivos ajustándolos a un volumen final de 10µL, como se muestra en la siguiente tabla.

Tabla 3. Volúmenes de reactivos para RT-PCR punto final.

Reactivo	Volumen (µL)
RT-PCR Buffer 5x	2
5x Q-Solution	2
dNTP mix	0.4
Iniciador sentido	0.2
Iniciador antisentido	0.2
Enzyme Mix	0.4
Agua libre de ARNasas	3.3
ARN purificado	1.5
Volumen total	10

Los iniciadores fueron utilizados a una concentración de 20 μM y se realizaron ensayos de variación de temperatura de alineamiento con gradientes hasta encontrar la óptima para cada par.

Se realizó, además, gradientes de concentración de iniciadores para determinar lo óptimo a utilizar, desde concentración final en la reacción por oligonucleótido de 0.2 hasta 0.7 μM .

6.4 RT-PCR tiempo real

Posterior al diagnóstico por PCR punto final, se tuvo disponible un kit comercial de PCR tiempo real (VetMAX™PEDV/TGEV/SDCoV Kit, Applied Biosystems Cat. A33402) para el diagnóstico múltiple de PDCoV, GET y DEP, lo que permitió determinar el número de coinfecciones de dos o las tres enfermedades. Esto se realizó en la Unidad de Investigación de la FMVZ, en el termociclador Rotor Gen Q 5plex HRM Qiagen ©, siguiendo las recomendaciones de los fabricantes.

6.5 Aislamiento viral

6.5.1 Preparación del inóculo

Una vez confirmado por medio de PCR el diagnóstico positivo de algunas muestras, se seleccionó una muestra de Yucatán por su bajo CT (15). Se tomó una alícuota y fue filtrada primero con Filtropur S 0.4 μm (Sarstedt© Cat. 83.1826) y después con Filtropur S 0.2 μm (Sarstedt© Cat. 83.1826.001) en esterilidad. El sobrenadante ya filtrado fue diluido 1:5 y 1:10 con DMEM (Gibco© Cat. 12800082 Lot. 1887988) y así fue utilizado como inóculo en cultivo celular.

6.5.2 Estandarización del protocolo de inoculación

Se realizó un ensayo en placas de 12 pozos (Thermo Scientific© Cat. 150628) con tres líneas celulares PK-15 (epitelio renal de cerdo), ST (epitelio testicular de cerdo) y VERO (epitelio renal de mono verde africano), se utilizó una placa por línea celular. Se prepararon los cultivos utilizando como medio de crecimiento Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco© DMEM 1X cat. 12800082) adicionado con el 10% de suero fetal bovino (Gibco© Cat 26140079). A las 24hrs se obtuvo una monocapa confluyente al 90%. Posteriormente, las células fueron lavadas con medio sin suero dos veces y se colocó en cada pozo 200 µl del inóculo. En la columna 1 se puso inóculo sin diluir, en la columna 2 inóculo diluido 1:5, en la 3 inóculo 1:10 y en la cuarta solo medio sin suero como testigo negativo (Imagen 4). Se incubaron las placas durante 60 minutos a una temperatura de 37° y una atmósfera de CO₂ al 5%, dentro de una incubadora (Fisher Scientific©). Pasados los 60 minutos el inóculo se retiró, se hicieron 2 lavados con PBS y se colocó 700µl de medio de mantenimiento sin suero en cada pozo.

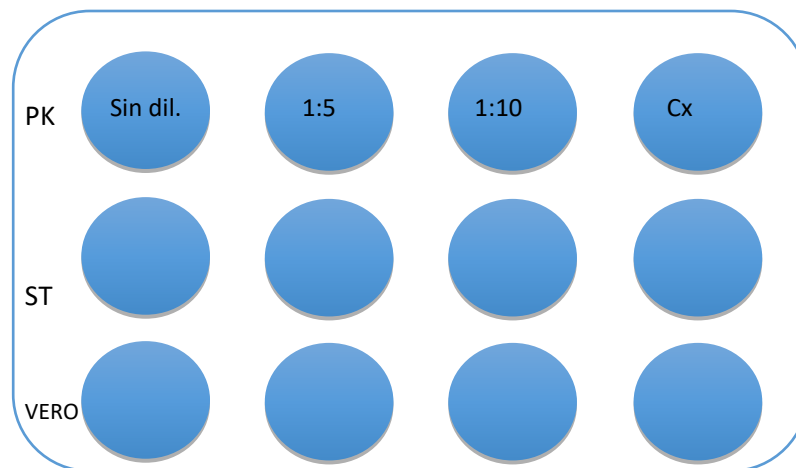


Imagen 4. Orden en el que fueron colocadas las líneas celulares y las concentraciones de los inóculos.

Además, se realizaron ensayos con las 3 líneas celulares para determinar el tiempo óptimo de inoculación, así como las condiciones adecuadas para llevarla a cabo, esto evaluando si presentaba o no toxicidad celular al dejar el inóculo, determinando la solución de lavado de las células y el tiempo de inoculación. Los resultados obtenidos fueron evaluados a través de PCR tiempo real (PDCoV Reagent Set POCKIT© Cat. #apls-069) y observando el daño citopático.

Varios autores refieren el uso de tripsina en el medio para beneficiar la infección del cultivo celular (Jung, Hu, & Saif, 2016b; Storz, Rott, & Kaluza, 1981; Wicht et al., 2014), debido a que actúa sobre el virus, al romper la proteína S en dos subunidades favoreciendo con esto la infección de las células. Además, se ha demostrado que la presencia de esta proteasa en el medio libera las partículas virales al sobrenadante al evitar la formación de agregados virales (Chen, Qi, Ganwu, Li, Thomas, Joseph, Stensland, Wendy, Pillatzki, 2015; Chen et al., 2014; Hofmann & Wyler, 1988; Hu et al., 2015; Jung & Saif, 2015; Shirato, Matsuyama, Ujike, & Taguchi, 2011). Por lo que se decidió llevar a cabo el ensayo con el uso de tripsina.

6.5.2.1 Uso de tripsina en el medio

Se preparó medio de crecimiento (DMEM) sin suero adicionado con Tripsina (Sigma- Aldrich©) a diferentes concentraciones, (2.5, 5, 7.5, 10, 12.5 y 15µg/ml), para evaluar el efecto que la tripsina pudiera tener sobre las células VERO y PK y así poder decidir la concentración a la que trabajaríamos.

Después de observar el efecto de la enzima sobre las células, como desprendimiento y redondeamiento, principalmente, se decidió trabajar con la concentración de 5µg/mL. Para este ensayo se prepararon placas de 4 pozos (Thermo Fisher© cat. 176740) con las diferentes líneas celulares (PK y VERO) con

medio (DMEM) con suero al 10%, a las 24 horas se obtuvo una monocapa confluyente entre el 80 y 90%. Previo a colocar en la monocapa celular el inóculo, éste fue diluido 1:5 con medio sin suero adicionado con tripsina a una concentración de 5µg/mL y se dejó incubar durante 20 minutos a 37 grados, posteriormente las monocapas fueron lavadas con medio sin suero y sin tripsina dos veces, y se colocaron 100 µL de inóculo en 2 de los cuatro pozos (pozos color naranja), mientras que en los otros dos solo se colocaron 100 µL medio sin suero con tripsina para utilizarlos como testigo negativo del ensayo (pozo color azul). En total se prepararon 3 placas de cada línea celular, una para evaluar el efecto del virus cada día. Las placas fueron incubadas durante 60 minutos a una temperatura de 37° y una atmósfera de CO₂ al 5%, dentro de una incubadora (Fisher Scientific®). Una vez concluido el tiempo de incubación, el inóculo fue retirado y se colocaron 400 µL de medio sin suero con tripsina. Las placas fueron revisadas diariamente. Una de las 3 placas de cada línea celular fue congelada a las 24 horas posteriores a la inoculación, otra a las 48 horas y la última a las 72 horas.

Al final del ensayo, las placas fueron congeladas y descongeladas 2 veces, se tomó el contenido de los pozos y éste se colocó en tubos de 2mL y fueron centrifugados a 2000 rpm por 10 minutos. Se hizo la purificación del ARN con el mismo protocolo mencionado anteriormente y la prueba de RT-PCR tiempo real específica para PDCoV.

6.6 Amplificación de gen S para secuenciación

La amplificación del gen S se realizó por medio de una estrategia diferente a la utilizada para el gen M. El gen S de PDCoV mide 3,483 nt, por ellos se diseñó un par de iniciadores para el gen completo (3,734 pb).

Para lograr la amplificación de este gen, primero se hizo la retrotranscripción (RT) del ARN viral a ADN complementario (ADNc) con la enzima Superscript II RT, Invitrogen ® (cat 18064014). Del producto de la RT se realizó la PCR con una

polimerasa de alta fidelidad (LongAmp Hot Start Taq 2X Master Mix, Biolabs® cat #M0533S). El protocolo llevado a cabo fue el siguiente: un ciclo de 94 grados 30 segundos, 35 ciclos de 94 grados 15 segundos, gradientes de temperatura de alineamiento durante 30 segundos y 65 grados por 4 minutos, finalmente un ciclo de extensión final a 65 grados por 10 minutos.

Los productos de la PCR se enviaron a secuenciación a la Unidad de Investigación de la FMCVZ. UNAM.

6.7 Análisis de secuencias

6.7.1 Determinación del porcentaje de identidad de las secuencias.

Las secuencias de nucleótidos obtenidas fueron comparadas frente a las secuencias reportadas en el GenBank, por medio de la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Tool) del NCBI. Con este análisis, se obtuvo el porcentaje de identidad de las secuencias obtenidas con base en las comparadas. Se eligieron secuencias de referencia, o los primeros aislamientos de los 7 países que tienen disponibles datos sobre PDCoV en GenBank, para poder llevar a cabo el alineamiento múltiple y la construcción de un árbol filogenético.

6.7.2 Alineamiento múltiple

Para realizar el alineamiento de las secuencias se llevó a cabo primero la traducción a proteína de las secuencias mexicanas en el programa ExpASY (<https://web.expasy.org/translate/>), posteriormente, en el programa Muscle de MEGA7, se realizó el alineamiento múltiple de las secuencias mexicanas en aminoácidos y las 10 secuencias de referencia o primeros aislamientos de los siete países que han secuenciado PDCoV.

Así mismo, se realizó un alineamiento de 44 secuencias de nucleótidos reportadas en el genbank y las secuencias de los aislamientos de diferentes regiones de México en el mismo programa MEGA 7 y se acotó el alineamiento al gen de interés.

6.7.3 Construcción de árbol filogenético

Para la construcción de los árboles de ambos alineamientos, se empleó el método basado en distancias Neighbor-Joining. El análisis Bootstrap se hizo al conjunto de datos en 1000 repeticiones en el software MEGA7® (Molecular Evolutionary Genetics Analysis. Versión 7).

6.8. Análisis de la estructura secundaria de la proteína S

La estructura secundaria y las propiedades de superficie de la proteína S de PDCoV se analizaron con los softwares Protean, DNASTar V.7.1 (Madison, WI, EE. UU.). La estructura secundaria de esta proteína se analizó mediante los métodos de Garnier-Robson y Chou-Fasman, y se analizó las propiedades de superficie, incluyendo hidrofobicidad, accesibilidad y antigenicidad mediante los métodos Kyte-Doolittle, Karplus-Schulz, Emini y Jameson-Wolf, respectivamente. Además, se confirmó la predicción adicional de las posiciones de los epítomos en el servicio en línea en <http://www.cbs.dtu.dk/services/BepiPred/>. La determinación de sitios potenciales de N-glicosilación de la proteína S se predijo con el software disponible en <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc>.

7. Resultados

7.1 Resultados de la estandarización de RT-PCR punto final

Después de haber realizado gradientes de temperatura de alineamiento de 53 a 58 grados se determinó que la temperatura óptima es 56 grados, donde se vio con

más claridad la amplificación de un fragmento de 793 pb correspondiente al gen M. El producto de esta reacción fue secuenciado.

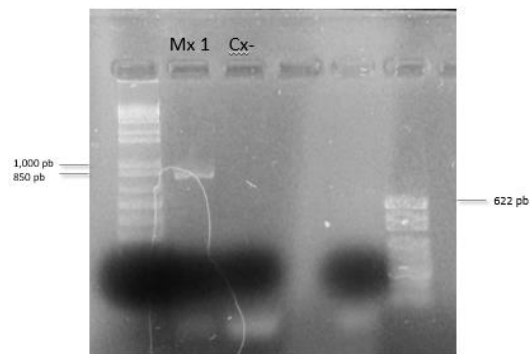


Imagen 4. Gel de agarosa al 2% teñido con Gelred© donde se observa fragmentos de 793pb correspondiente al gen M. Mx1 (Muestra 1), Cx- (testigo negativo).

Se analizaron por este método las 885 muestras colectadas, de las cuales 85, es decir, el 9.6% de las muestras resultaron positivas a PDCoV. En el siguiente mapa se muestra la distribución de las muestras positivas y en el cuadro el total de muestras y positivas por región, así como su porcentaje (Tabla 4, Imagen 5).

Tabla 4. Número total de muestras y porcentaje de positivos por región.

Región	n	Positivos	%
Centro	246	38	15.4
Sureste	180	24	13.3
Noreste	45	5	11.1
Noroeste	48	2	4.2
Este	366	16	4.4
Total	885	85	9.6

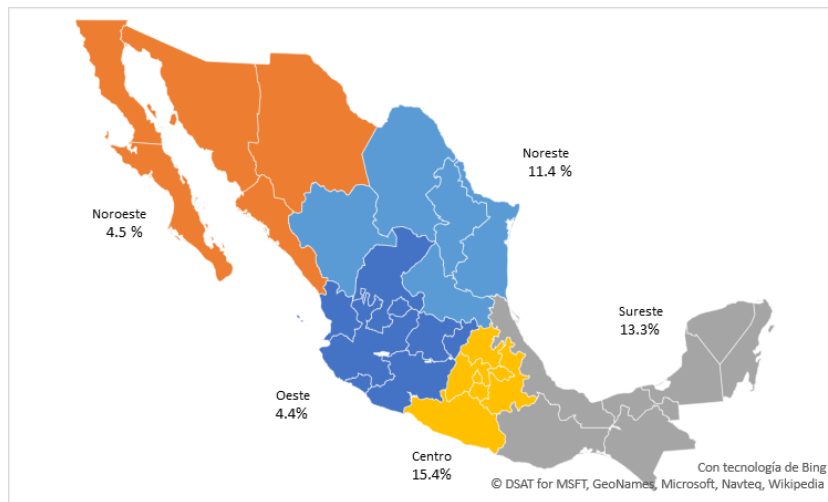


Imagen 5. Mapa de México con el porcentaje de muestras positivas por región.

7.2 Resultados de RT-PCR tiempo real

Se analizaron por RT-PCR tiempo real múltiple la detección de PDCoV, DEPV y GETv en 885 muestras disponibles provenientes de 15 estados distintos de la República Mexicana con la finalidad de determinar coinfecciones. Los resultados mostraron que la coinfección más frecuente fue la de PDCoV con el virus de la diarrea epidémica porcina con un porcentaje de 5.1% de las muestras, seguido de un 1.8% de coinfecciones entre deltacoronavirus porcino con DEP y GET (Tabla 5). Estos resultados coinciden con los reportados en China y en Estados Unidos donde se ha reportado que es frecuente que PDCoV se presente en conjunto con otros patógenos, especialmente el virus causante de la diarrea epidémica porcina (Chen et al., 2014; Ma et al., 2015; Mai et al., 2017). Song y colaboradores sugieren que animales afectados simultáneamente por PDCoV y DEP pudieran presentar signos clínicos más severos (D. Song et al., 2015).

Tabla 5. Número y porcentaje de coinfecciones por región.

<i>Región</i>	<i>n</i>	<i>No. de muestras positivas</i>	<i>% de positivos</i>	<i>PDCoV (+ / %)</i>	<i>PDCoV/PEDv (+ / %)</i>	<i>PDCoV/TGEv (+ / %)</i>	<i>PDCoV/PEDv/TGEv (+ / %)</i>
Centro	246	38	15.4	2 / 0.8	24 / 9.7	0	12 / 4.9
Sureste	180	24	13.3	6 / 3.3	10 / 5.5	6 / 3.3	2 / 1.1
Noreste	45	5	11.1	2 / 4.4	2 / 4.4	1 / 2.2	0
Noroeste	48	2	4.2	0	0	1 / 2.1	1 / 2.1
Este	366	16	4.4	4 / 1.1	10 / 2.7	1 / .3	1 / .3
Total	885	85	9.6	14 / 1.6	46 / 5.2	9 / 1.0	4 / 0.4

7.3 Resultados de aislamiento viral en cultivo celular

Como se describe en la literatura, se observó que las líneas más adecuadas para el aislamiento de PDCoV son la PK-15 y la ST. Sin embargo, no se descartó el uso de células VERO (Chen et al., 2015; Hu et al., 2015; Jung, Hu, & Saif, 2016a). Con respecto a la dilución de los inóculos, se concluyó que el inóculo sin diluir resultaba muy tóxico para las células ya que se presentó muerte de estas desde el primer día posterior a la inoculación.

Las células ST no tuvieron una buena respuesta durante los ensayos, ya que las botellas control presentaban a las 24-48 hrs desprendimiento en nata del 60% de la monocapa. Sin embargo, se continuó hasta completar el ensayo.

Las células PK presentaron a los 4-5 dpi (días post inoculación) efecto citopático como agrupamiento de células, desprendimiento de la monocapa y aparición de sincitios. Pero eran efectos muy tenues. Mientras que en las células VERO se observaron efectos similares a los presentados en las células PK además de la presencia de vacuolas en el citoplasma. Por otro lado, la cinética evaluada en PCR tiempo real arrojó los siguientes resultados:

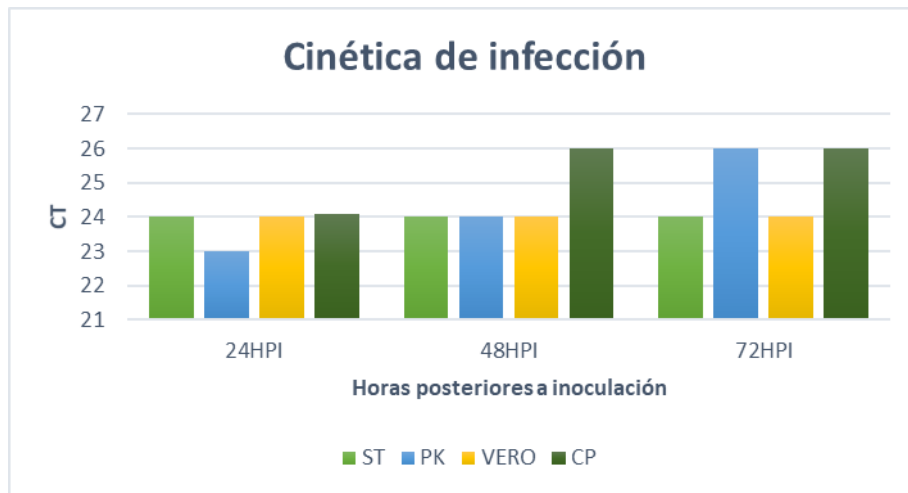


Imagen 6. Cinética de infección de 3 líneas celulares y cultivo primario (CP) con PDCoV de las 24 a las 72 horas posteriores a la infección.

Como se observa en la imagen 6, las células donde se obtuvo un CT menor fue en las células PK a las 24 horas posteriores a la infección. En general, podríamos concluir que las 3 líneas celulares responden de manera similar a la inoculación y que el mejor tiempo para la obtener un sobrenadante con una carga viral inferida menor, es al primer día posterior a la inoculación.

7.4 Resultados de la amplificación del gen S

Se realizaron ensayos modificando algunos tiempos y temperaturas. Se estandarizó la PCR para el gen S quedando de la siguiente manera:

Tabla 6. Protocolo de la PCR para la amplificación del gen S

PASO	TEMPERATURA	TIEMPO
DESNATURALIZACIÓN INICIAL	94° C	2 minutos
DESNATURALIZACIÓN	94° C	30 segundos
HIBRIDACIÓN	54° C	30 segundos
EXTENSIÓN	65° C	4 minutos
EXTENSIÓN FINAL	65° C	10 minutos

El fragmento amplificado es de 3,734 pb y se determinó que la temperatura óptima es de 54 grados (Imagen 7).

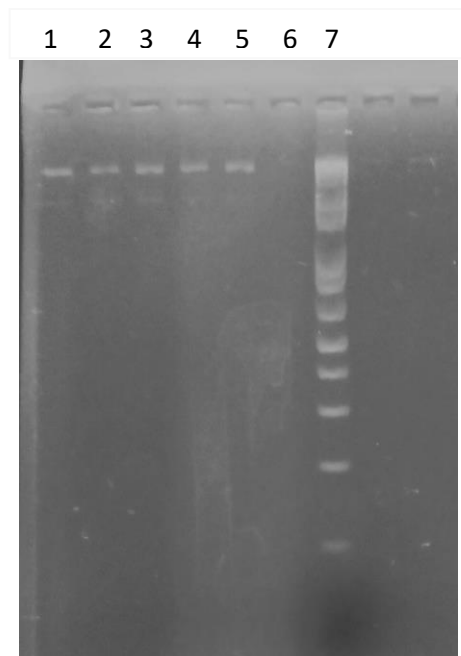


Imagen 7. Gel de agarosa al 2% teñido con Gelred© donde se observan gradientes de temperaturas de alineamiento para la amplificación del gen S completo, tamaño esperado (3,734pb). Del carril 1 al 5 gradientes de temperatura, carril 6 testigo negativo y 7 marcador de peso.

Se obtuvieron 4 secuencias completas del gen S de 4 estados distintos de la República Mexicana. Los estados son: Estado de México, Querétaro, Oaxaca y Yucatán, los tres primeros pertenecen a muestras colectadas en 2017, mientras que la de Yucatán fue colectada en 2015.

7.5 Porcentaje de identidad de las secuencias.

Se realizó el mapeo de las secuencias del gen S en el programa BLAST para conocer el porcentaje de identidad con respecto a secuencias presentes en el GenBank. Se observó que las 4 secuencias obtenidas del virus PDCoV tienen un porcentaje que va del 99-97%. Es importante señalar que en esta base de datos hay secuencias de Estados Unidos, China, Tailandia, Japón, Vietnam, Corea del Sur y Lao.

7.6 Construcción del árbol filogenético

Para poder realizar la inferencia filogenética, primero se llevó a cabo la selección de secuencias representativas de diferentes países disponibles en el GenBank. Posteriormente, se hizo el alineamiento múltiple de las secuencias de nucleótidos en el programa MEGA7 y después se construyó el árbol por el método de Neighbor-Joining.

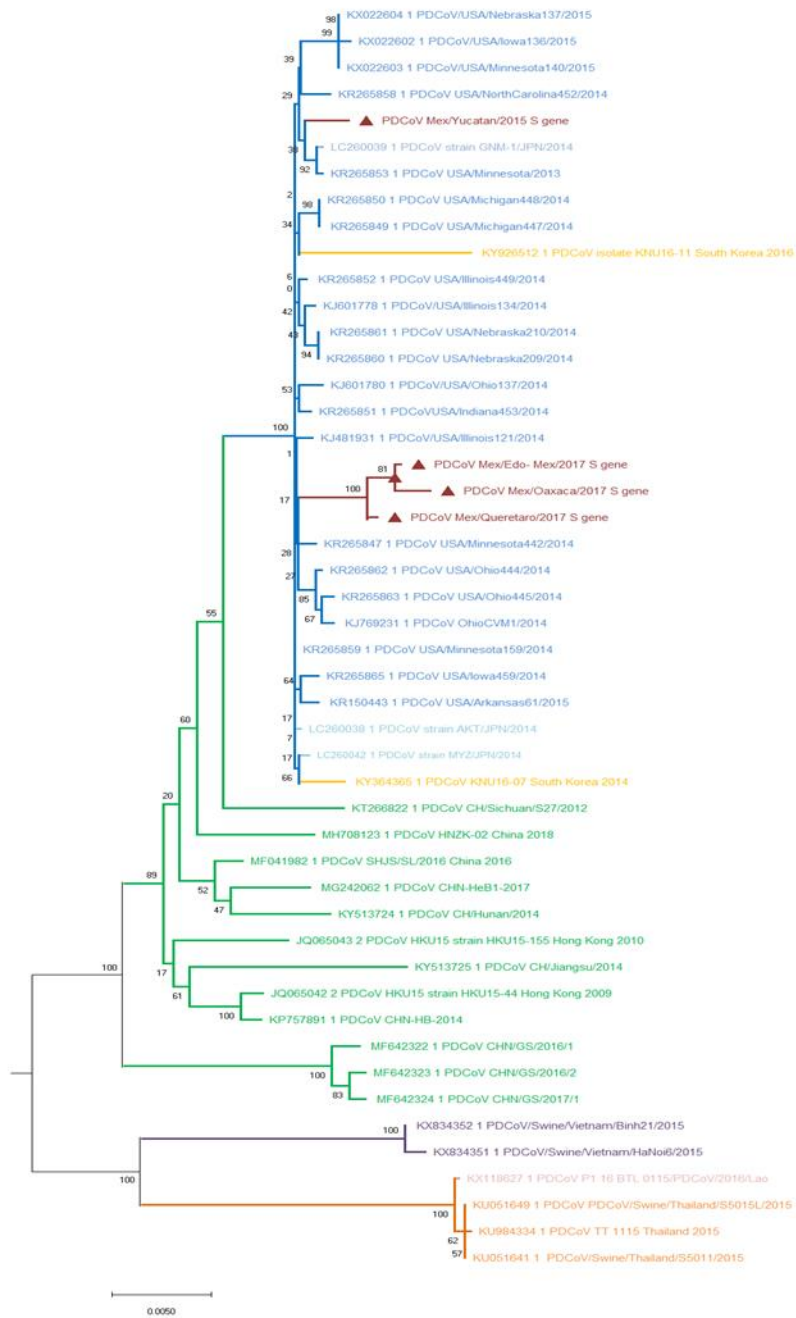


Imagen 8. Árbol del gen S construido en MEGA7, utilizando el método Neighbour-Joining. Bootstrap de 1000 repeticiones. La barra representa las sustituciones de nt por sitio. Las secuencias mexicanas se observan en color rojo y marcadas con un triángulo.

De acuerdo con la estructura del árbol, podemos observar que se forman 3 grupos principales. En el primer grupo se encuentran secuencias de China, en el segundo se agrupan las secuencias de Tailandia, Lao y Vietnam. Finalmente, en el tercer grupo encontramos secuencias de Estados Unidos, Japón y Corea del Sur (Imagen 8). En este tercer grupo también se encuentran las secuencias del gen S de México, que forman 2 clados, uno por secuencias de 2017 y el segundo por la secuencia de 2015. Sin embargo, se agrupan cerca de las cepas de los Estados Unidos.

7.7 Análisis de las secuencias

La proteína S tiene la misma estructura para todos los coronavirus. Es el más estudiado debido al papel desempeñado por ser el que se une al receptor y, por lo tanto, determina el tropismo, además de mediar en la fusión de membranas para la entrada del virus en la célula. Dentro del coronavirus, el género deltacoronavirus es el que tiene la proteína S más pequeña, pero la estructura es la misma, se divide en 2 subunidades S1 (1-573 aa) y S2 (574-1160 aa) (Thachil, Gerber, Xiao, Huang, & Opriessnig, 2015).

Se obtuvieron cuatro secuencias del gen S completo de 3 regiones diferentes, a las que se designaron los siguientes nombres PDCoV Mex-Yuc 2015 (número de acceso GenBank MK478381), PDCoV Mex-Oax 2017 (número de acceso GenBank MK478383) (Sureste), PDCoV Mex-Edo Mex 2017 (número de acceso GenBank MK478382) (Centro) y PDCoV Mex-Qro 2017 (número de acceso GenBank MK478380)(oeste). El gen S de las cuatro secuencias mexicanas está compuesto por 3,480 nts y tenía una identidad de nucleótidos de 99.6% con respecto a las cepas norteamericanas, además de presentar una homología de 98.2 a 98.7% con secuencias chinas y 96.5 y 96.1% con secuencias de Vietnam y Tailandia, respectivamente.

Se realizó un análisis comparativo más detallado de las cepas mexicanas contra las secuencias de aminoácidos del gen S de las cepas Ilinios121 / 2014 (Número de acceso AHL45007) y de la cepa Ohio137 / 2014 (Número de acceso AIB07807), de los cuales se conoce su estructura por microscopía electrónica (Shang et al., 2018; Xiong et al., 2018). Observamos la mutación de aminoácidos en 6 sitios (110 E / D, 221 N / K, 510 NI, 534 KN, 550 IL, 624 AV). Sin embargo, solo la mutación en el sitio 510 donde de asparagina (N) un aminoácido polar cambió a isoleucina (I) un aminoácido no polar, cambiando la hidrofobicidad de la molécula en ese sitio, no obstante, al realizar el análisis con el modelo estructural de esta proteína de superficie y en análisis de predictivo de propiedades de superficie (protean) se observó que los cambios no impactan ni en la estructura ni aparente comportamiento de la proteína.

Tabla 7. Aminoácido sustituido y sitio donde se encuentra

Identificación / Proorción aminoácido	S1											S2			
	38	40	52	110	149	221	267	429	510	534	550	551	624	955	1068
AHL45007.1 ProDCoV/USA/Illinois121/2014	Pro	Arg	Asp	A.Glu	His	Asp	Ser	Iso	Asp	Lis	Iso	Val	Ala	Tre	Ala
AIB07807.1 ProDCoV/USA/Ohio137/2014	Pro	Arg	Asp	A.Glu	His	Asp	Ser	Iso	Asp	Lis	Iso	Val	Ala	Tre	Ala
ProDCoV Mex-Yuc 2015	Pro	Arg	Asp	A.Asp	His	Lis	Ser	Iso	Iso	Asp	Leu	Val	Val	Tre	Ala
ProDCoV Edo Mex 2017	Pro	Arg	Asp	A.Glu	His	Asp	Tre	Iso	Asp	Lis	Iso	Val	Ala	Tre	Tre
ProDCoV Mex-Oax 2017	Pro	Arg	Asp	A.Glu	Tir	Asp	Ser	Tre	Asp	Lis	Iso	Val	Ala	Ala	Tre
ProDCoV Mex-Qro 2017	Pro	Arg	Asp	A.Glu	His	Asp	Ser	Iso	Asp	Lis	Iso	Val	Ala	Ala	Tre
AFD29194.1 Proorcine coronavirus HKU15-155	Leu	Ser	-	A.Glu	His	Asp	Ser	Iso	Asp	Lis	Iso	Ala	Ala	Tre	Ala
AFD29187.1 Proorcine coronavirus HKU15-44	Pro	Arg	Asp	A.Glu	His	Asp	Ser	Iso	Asp	Lis	Iso	Ala	Ala	Tre	Ala
AKO63083.1ProDCoV Sichuan S27/2012	Pro	Ser	-	A.Glu	His	Asp	Ser	Iso	Asp	Lis	Iso	Val	Ala	Tre	Ala
AML40860.1 ProDCoV Minnesota159/2014	Pro	Arg	Asp	A.Glu	His	Asp	Ser	Iso	Asp	Lis	Iso	Val	Ala	Tre	Ala
AML40902.1 ProDCoV Iowa/2014	Pro	Arg	Asp	A.Glu	His	Asp	Ser	Iso	Asp	Lis	Iso	Val	Ala	Tre	Ala
ALJ32185.1 Proorcine coronavirus HKU15 OH11846	Pro	Arg	Asp	A.Glu	His	Asp	Ser	Iso	Asp	Lis	Iso	Val	Ala	Tre	Ala
BAZ95609.1 Proorcine deltacoronavirus JAProAN/2016	Pro	Arg	Asp	A.Glu	His	Asp	Ser	Iso	Asp	Lis	Iso	Val	Ala	Tre	Ala
				1	3	4			9		10				

Las secuencias mexicanas se encuentran en color rojo. Los recuadros enmarcan los sitios donde hay sustituciones y que pertenecen a epítomos. Los aminoácidos en el recuadro amarillo significan que es una sustitución exclusiva de una secuencia mexicana en comparación con las de referencia.

Con el análisis de Protean, se determinaron propiedades de superficie, incluyendo hidrofobicidad, regiones flexibles, accesibilidad y antigenicidad mediante los métodos Kyte-Doolittle, Karplus-Schulz, Emini y Jameson-Wolf, respectivamente (Imagen 10).

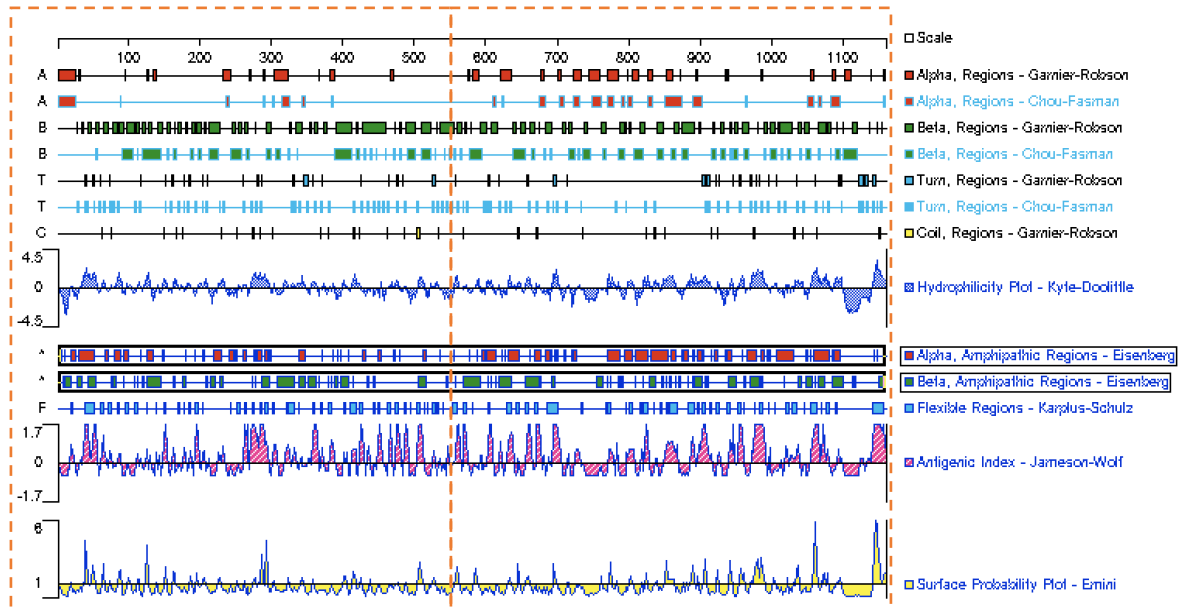


Imagen 9. Resultados del análisis de protean del gen S de PDCoV Mex/Yuc 2015 los cuadros dividen la proteína en sus dos subunidades S1 y S2.

Comparando la secuencia de las 11 regiones antigénicas reportadas previamente por Mai y colaboradores en 2017 contra las secuencias mexicanas, encontramos seis mutaciones y una inserción en cuatro de los 11 epítopes (Tabla 8). Observamos en la posición 38 a 53, una inserción de asparagina (N) y dos sustituciones, una de leucina (L) por prolina (P), ambos no polares y la segunda de arginina (R) por serina (S), ambos polares (N), estos cambios incrementaron en el índice antigénico, probabilidad superficial y nivel hidrofílico de acuerdo por la predicción hecha (Imagen 9) (Mai et al., 2017). Asimismo, se ubicaron 17 glicosilaciones en toda la región S1, las mismas que las predichas por Xiaoli, X con la cepa Illinois 2014 (Tabla 9). Conocer los sitios de glicosilación es importante en el estudio de la antigenicidad del virus, ya que es una estrategia viral para evadir el sistema inmunitario del hospedero (Shang et al., 2018). Sabemos que la respuesta inmune de las células B es contra la proteína Spike (Mai et al., 2017).

Sin embargo, serían necesarios estudios más profundos para evaluar si estas predicciones coinciden con la antigenicidad y patogenicidad reales de la proteína.

Tabla 8. Comparación de las secuencias de las regiones antigénicas previamente reportadas frente a la secuencia PDCoV/Yucatán 2015.

	HKU15-155			CHN-GD16-05			PDCoV MEX/YUC 2015	
	Posición	Secuencia de aminoácidos	Posición	Secuencia de aminoácidos	Posición	Secuencia de aminoácidos		
1	38-52	LTSNSSSLYSRANNF	38-52	LTSNSSSLYSRANNF	38-53	PTRNSSSLYSRANNF		
2	57-63	LPGYPTK	58-64	LPGYPTK	58-64	LPGYPTK		
3	108-113	SEIQTY	147-150	GQHG	109-114	SDIQTY		
4	146-149	GQHG	160-165	QSNYTT	147-150	GQHG		
5	272-290	SSHEVEDGFYSDPKSAVRA	273-291	SSHEVEDGFYSDPKSAVRA	273-291	SSHEVEDGFYSDPKSAVRA		
6	327-334	INGNTSYC	328-335	INGNTSYC	328-335	INGNTSYC		
7	409-426	EGQHTGTTSVHATDTSS	410-427	EGQHTGTTSVHATDTSS	410-427	EGQHTGTTSVHATDTSS		
8	459-465	FTSPTGE	460-466	FTSPTGE	460-466	FTSPTGE		
9	501-511	TSSNSTENRF	502-512	TSSNSTENRF	502-512	TSSNSTENRF		
10	548-560	AIAGTSTLQNRTP	570-574	EVEIP	549-561	ALVGTSTLQNRTP		
11	569-573	EVEIP			570-574	EVEIP		

Mai, K et al, 2017

Tabla 9. Comparación de los sitios de glicosilación reportados previamente con los predichos en este estudio.

Sitios de glicosilación			
Illinois 121 Xiaoli, X 2018	Mex/Yucatán 2015	Ohio 137 Shang, J 2018	
		Observados	Predicho
41	*		
74	*	*	
99	*		*
162	*	*	
169	*		*
184	*	*	
341	*	*	
351	*	*	
311	*	*	*

331	*		
472	*	*	
494	*	*	
505	*		*
526	*	*	
531	*		*
652	*		*
661	*	*	
788	*	*	
914	*	*	
945	*		*
970	*		*
1003	*	*	
1020	*		
1044	*		
1049	*		
1069	*		
1079	*		

El asterisco señala que en ese sitio se predijo o encontró glicosilación según el caso.

8. Discusión

La coinfección más frecuente fue PDCoV / PEDV, encontró en el 54,1% del total de casos positivos de deltacoronavirus (46/85), un resultado que coincide con el informado por otros autores (Song et al., 2015; J. Zhang, 2016). Las coinfecciones con TGEV son las menos frecuentes (10,6%; 9/85), mientras que el 16,5% (14/85) de las muestras presentaron el PDCoV como el único agente infeccioso. La región centro presentó el mayor porcentaje de muestras positivas (15.4%; 38/246), seguida de la región sureste (13.3%; 24/180), que se caracterizan por tener granjas de cerdos altamente productivas (Tabla 1, Figura 1). Además, es interesante que un número considerable de muestras (16/85) fueron positivas para los tres agentes virales estudiados (PDCoV / PEDv / TGEv).

La proteína S tiene la misma estructura en todos los coronavirus. Es la proteína más estudiada debido al papel que desempeña en la unión al receptor y, por lo tanto, en la determinación del tropismo, además de mediar en la fusión de las membranas para la entrada del virus en la célula (Li et al., 2018; Shang et al., 2018) . Dentro de los coronavirus, el género Deltacoronavirus es el que tiene la proteína S más pequeña; sin embargo, la estructura es la misma; se divide en 2 subunidades, S1 (1 -573 aa) y S2 (574 -1160 aa) (Thachil, Gerber, Xiao, Huang, y Opriessnig, 2015).

Se obtuvieron cuatro secuencias del gen S completo de 3 regiones diferentes, a las que se designaron los siguientes nombres PDCoV Mex / Yuc 2015, PDCoV Mex / Oax 2017 (sureste), PDCoV Mex / Edo Mex 2017 (Centro) y PDCoV Mex / Qro 2017 (oeste). El gen S de las cuatro secuencias mexicanas está compuesto por 3,480 nt y tiene una identidad de nucleótidos entre ellas de 99.4% en promedio. La identidad más alta se encontró entre las cepas de Edo Mex y Oax (99.8%) y el valor de identidad más bajo se encontró entre PDCoV Mex / Yuc 2015, PDCoV Mex / Oax 2017 (sureste) (99%). Las secuencias del gen S obtenidas de aislamientos mexicanos compartieron un 99.6% de identidad de nucleótidos con respecto a las cepas norteamericanas. Además, presenta una homología del 98 al 98,7% con los chinos. Secuencias y 96.5 y 96.1% con secuencias de Vietnam y Tailandia, respectivamente.

Se realizó un análisis comparativo más detallado de las cepas mexicanas contra las secuencias de aminoácidos del gen S de las cepas Illinois121 / 2014 (número de acceso de GenBank AHL45007) y Ohio137 / 2014 (número de acceso de GenBank AIB07807), que tienen estructuras conocidas por microscopía electrónica (Shang et al., 2018; Xiong et al., 2018). Observamos la mutación de aminoácidos en 6 sitios (110 E / D, 221 N / K, 510 N/I, 534 K/N, 550 I/L, 624 A/V).

9. Conclusiones

Con este trabajo pudimos determinar que el deltacoronavirus porcino se encuentra circulando en México con una frecuencia arriba de lo esperado. Así mismo, vimos que con frecuencia PDCoV se asocia con otros patógenos, principalmente DEPV e incluso con GETv. Las cepas mexicanas son filogenéticamente más cercanas a las reportadas en los Estados Unidos, sin embargo, forman dos clados distintos con base en el año de aislamiento. Todo esto apoya la teoría de la distribución global actual de deltacoronavirus porcino.

Un análisis adicional de la estructura y los cambios encontrados en la proteína S del PDCoV de México son necesarios para determinar su grado de patogenicidad y antigenicidad.

10. Referencias

- Bosch, B. (2004). *The coronavirus spike protein: mechanisms of membrane fusion and virion incorporation*. Retrieved from <http://igitur-archive.library.uu.nl/dissertations/2005-0301-003047/title.pdf>
- Chan, J. F. W., Lau, S. K. P., To, K. K. W., Cheng, V. C. C., Woo, P. C. Y., & Yue, K. Y. (2015). Middle East Respiratory syndrome coronavirus: Another zoonotic betacoronavirus causing SARS-like disease. *Clinical Microbiology Reviews*, *28*(2), 465–522. <https://doi.org/10.1128/CMR.00102-14>
- Chen, Qi, Ganwu, Li, Thomas, Joseph, Stensland, Wendy, Pillatzki, A. (2015). Isolation and characterization of Porcine Deltacoronavirus from pigs with diarrhea in the United States. *Journal of Clinical Microbiology*, *4*(31), 15.
- Chen, Q., Gauger, P., Stafne, M., Thomas, J., Arruda, P., Burrough, E., ... Zhang, J. (2015). Pathogenicity and pathogenesis of a United States porcine deltacoronavirus cell culture isolate in 5-day-old neonatal piglets. *Virology*, *482*, 51–59. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2015.03.024>
- Chen, Q., Li, G., Stasko, J., Thomas, J. T., Stensland, W. R., Pillatzki, A. E., ... Zhang, J. (2014). Isolation and characterization of porcine epidemic diarrhea viruses associated with the 2013 disease outbreak among swine in the united states. *Journal of Clinical Microbiology*, *52*(1), 234–243. <https://doi.org/10.1128/JCM.02820-13>
- Dong, N., Fang, L., Zeng, S., Sun, Q., Chen, H., & Xiao, S. (2015). Porcine Deltacoronavirus in mainland China. *Emerging Infectious Diseases*, *21*(12), 2254–2255. <https://doi.org/10.3201/eid2112.150283>
- Fehr, A., & Perlman, S. (2015). Coronaviruses: an overview of their replication and pathogenesis. In H. J. Maier, E. Bickerton, & P. Britton (Eds.), *Coronaviruses: Methods and Protocols* (pp. 1–282). Hatfield, Hertfordshire: Humana press.

<https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2438-7>

- Fung, T. S., & Liu, D. X. (2014). Coronavirus infection, ER stress, apoptosis and innate immunity. *Frontiers in Microbiology*, 5(JUN). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00296>
- Hofmann, M., & Wyler, R. (1988). Propagation of the virus of porcine epidemic diarrhea in cell culture. *Journal of Clinical Microbiology*, 26(11), 2235–2239.
- Homwong, N., Jarvis, M. C., Ching, H., Diaz, A., Rovira, A., Nelson, M., & Marthaler, D. (2015). Characterization and evolution of porcine deltacoronavirus in the United States. *Preventive Veterinary Medicine*, 123(September 2014), 168–174. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1016/j.prevetmed.2015.11.001>
- Hu, H., Jung, K., Vlasova, A. N., Chepngeno, J., Lu, Z., Wang, Q., & Saif, L. J. (2015). Isolation and Characterization of Porcine Deltacoronavirus from Pigs with Diarrhea in the United States. *Journal of Clinical Microbiology*, 53(5), JCM.00031-15. <https://doi.org/10.1128/JCM.00031-15>
- Huang, Y. W., Dickerman, A. W., Pineyro, P., Li, L., Fang, L., Kiehne, R., ... Meng, X. J. (2013). Origin, evolution, and genotyping of emergent porcine epidemic diarrhea virus strains in the United States. *MBio*, 4(5), e00737-13. <https://doi.org/10.1128/mBio.00737-13>
- ICTV. (2018). Virus Taxonomy: 2018 Release ICTV. Retrieved November 6, 2018, from https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/positive-sense-rna-viruses-2011/w/posrna_viruses/222/coronaviridae
- Jung, K., Hu, H., & Saif, L. J. (2016a). Porcine deltacoronavirus induces apoptosis in swine testicular and LLC porcine kidney cell lines in vitro but not in infected intestinal enterocytes in vivo. *Veterinary Microbiology*, 182, 57–63.
- Jung, K., Hu, H., & Saif, L. J. (2016b). Porcine deltacoronavirus infection: Etiology, cell culture for virus isolation and propagation, molecular epidemiology and

pathogenesis. *Virus Research*, 226, 50–59.
<https://doi.org/10.1016/j.virusres.2016.04.009>

Jung, K., Hu, H., & Saif, L. J. (2017). Calves are susceptible to infection with the newly emerged porcine deltacoronavirus, but not with the swine enteric alphacoronavirus, porcine epidemic diarrhea virus. *Archives of Virology*, 1–6.
<https://doi.org/10.1007/s00705-017-3351-z>

Jung, K., & Saif, L. J. (2015). Porcine epidemic diarrhea virus infection: Etiology, epidemiology, pathogenesis and immunoprophylaxis. *Veterinary Journal*, 204(2), 134–143. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2015.02.017>

Li, W., Hulswit, R. J. G., Kenney, S. P., Widjaja, I., Jung, K., & Alhamo, M. A. (2018). Broad receptor engagement of an emerging global coronavirus may potentiate its diverse cross-species transmissibility. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(20), 1–9.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1802879115>

Liu, B. J., Zuo, Y. Z., Gu, W. Y., Luo, S. X., Shi, Q. K., Hou, L. S., ... Fan, J. H. (2018). Isolation and phylogenetic analysis of porcine deltacoronavirus from pigs with diarrhoea in Hebei province, China. *Transboundary and Emerging Diseases*, 65(3), 874–882. <https://doi.org/10.1111/tbed.12821>

Ma, Y., Zhang, Y., Liang, X., Lou, F., Oglesbee, M., Krakowka, S., & Li, J. (2015). Origin, Evolution, and Virulence of Porcine Deltacoronaviruses in the United States. *Microbiology*, 6(2), 1–13. <https://doi.org/10.1128/mBio.00064-15>.Invited

Mai, K., Feng, J., Chen, G., Li, D., Zhou, L., Bai, Y., ... Ma, J. (2017). The detection and phylogenetic analysis of porcine deltacoronavirus from Guangdong Province in Southern China. *Transboundary and Emerging Diseases*, (November 2016), 166–173. <https://doi.org/10.1111/tbed.12644>

Marthaler, D., Jiang, Y., Collins, J., & Rossow, K. (2014a). Complete genome

- sequence of strain SDCV/USA/Illinois121/2014, a porcine Deltacoronavirus from the United States. *Genome Announcements*, 2(2), 2–3. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00218-14>. Copyright
- Marthaler, D., Jiang, Y., Collins, J., & Rossow, K. (2014b). Porcine Deltacoronavirus from the United States. *Genome Announcements*, 2(2), 2–3. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00218-14>. Copyright
- Marthaler, D., Raymond, L., Jiang, Y., Collins, J., Rossow, K., & Rovira, A. (2014). Rapid detection, complete genome, and phylogenetic analysis of Porcine Deltacoronavirus (Technical Appendix). *Emerging Infectious Diseases*, 20(8), 1347–1350. <https://doi.org/http://dx.dpi.org/10.3201/eid2008.14-0526>
- Masters, P. S. (2006). The Molecular Biology of Coronaviruses. *Advances in Virus Research*, 66, 193–292. [https://doi.org/10.1016/S0065-3527\(06\)66005-3](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(06)66005-3)
- Sawicki, S. G., Sawicki, D. L., & Siddell, S. G. (2007). A Contemporary View of Coronavirus Transcription. *Journal of Virology*, 81(1), 20–29. <https://doi.org/10.1128/JVI.01358-06>
- Sawicki, Stanley G. (2009). Coronavirus Genome Replication. *Viral Genome Replication*. <https://doi.org/10.1007/b135974>
- Shang, J., Zheng, Y., Yang, Y., Liu, C., Geng, Q., Tai, W., ... Li, F. (2018). Cryo-electron microscopy structure of porcine deltacoronavirus spike protein in the prefusion state. *Journal of Virology*, 92(4), 1–14. <https://doi.org/10.1128/jvi.01556-17>
- Shirato, K., Matsuyama, S., Ujike, M., & Taguchi, F. (2011). Role of proteases in the release of porcine epidemic diarrhea virus from infected cells. *Journal of Virology*, 85(15), 7872–7880. <https://doi.org/10.1128/JVI.00464-11>
- Song, D., Zhou, X., Peng, Q., Chen, Y., Zhang, F., Huang, T., ... Tang, Y. (2015). Newly Emerged Porcine Deltacoronavirus Associated With Diarrhoea in Swine in China: Identification, Prevalence and Full-Length Genome Sequence

- Analysis. *Transboundary and Emerging Diseases*, 62(6), 575–580. <https://doi.org/10.1111/tbed.12399>
- Song, Daesub, & Park, B. (2012). Porcine epidemic diarrhoea virus: a comprehensive review of molecular epidemiology, diagnosis, and vaccines. *Virus Genes*, 44(2), 167–175. <https://doi.org/10.1007/s11262-012-0713-1>
- Storz, J., Rott, R., & Kaluza, G. (1981). Enhancement of plaque formation and cell fusion of an enteropathogenic coronavirus by trypsin treatment. *Infection and Immunity*, 31(3), 1214–1222.
- Thachil, A., Gerber, P. F., Xiao, C. T., Huang, Y. W., & Opriessnig, T. (2015). Development and application of an ELISA for the detection of porcine deltacoronavirus IgG antibodies. *PLoS One*, 10(4), e0124363. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0124363>
- Ujike, M., & Taguchi, F. (2015). Incorporation of spike and membrane glycoproteins into coronavirus virions. *Viruses*, 7(4), 1700–1725. <https://doi.org/10.3390/v7041700>
- USDA. (2017). *Swine Enteric Coronavirus Disease (SECD) Situation Report – Nov 30 , 2017*. USA. Retrieved from https://www.aphis.usda.gov/animal_health/animal_dis_spec/swine/downloads/secd_sit_rep_11_30_17.pdf
- Wang, L., Byrum, B., & Zhang, Y. (2014). Detection and Genetic Characterization of Deltacoronavirus in Pigs, Ohio, USA, 2014. *Emerging Infectious Diseases*, 20(7), 1227–1230. <https://doi.org/10.3201/eid2007.140296>
- Wicht, O., Li, W., Willems, L., Meuleman, T. J., Wubbolts, R. W., van Kuppeveld, F. J. M., ... Bosch, B. J. (2014). Proteolytic activation of the porcine epidemic diarrhea coronavirus spike fusion protein by trypsin in cell culture. *Journal of Virology*, 88(14), 7952–7961. <https://doi.org/10.1128/JVI.00297-14>
- Woo, P. C. Y., Lau, S. K. P., Lam, C. S. F., Lau, C. C. Y., Tsang, A. K. L., Lau, J.

- H. N., ... Yuen, K.-Y. (2012). Discovery of Seven Novel Mammalian and Avian Coronaviruses in the Genus Deltacoronavirus Supports Bat Coronaviruses as the Gene Source of Alphacoronavirus and Betacoronavirus and Avian Coronaviruses as the Gene Source of Gammacoronavirus and Deltacoronavi. *Journal of Virology*, 86(7), 3995–4008. <https://doi.org/10.1128/JVI.06540-11>
- Xiong, X., Tortorici, A., Snijder, J., Yoshioka, C., Walls, A., Li, W., ... Veessier, D. (2018). Glycan shield and fusion activation of a deltacoronavirus spike glycoprotein fine-tuned for enteric infections. *J of Virology*, 92(4), 1–16. <https://doi.org/https://doi.org/10.1128/JVI.01556-1>
- Zhang, J. (2016). Porcine deltacoronavirus: Overview of infection dynamics, diagnostic methods, prevalence and genetic evolution. *Virus Research*, 226, 71–84. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2016.05.028>
- Zhu, X., Liu, S., Wang, X., Luo, Z., Shi, Y., Wang, D., ... Xiao, S. (2018). Contribution of porcine aminopeptidase N to porcine deltacoronavirus infection. *Emerging Microbes and Infections*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41426-018-0068-3>



First report and phylogenetic analysis of porcine deltacoronavirus in Mexico

Claudia Pérez-Rivera¹ | Humberto Ramírez-Mendoza² | Susana Mendoza-Elvira³ |
Rene Segura-Velázquez⁴ | José Ivan Sánchez-Betancourt¹

¹Departamento de Medicina y Zootecnia de Cerdos, FMVZ-UNAM, Mexico City, Mexico

²Departamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ), Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Mexico City, Mexico

³Laboratorio de Microbiología, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM, Mexico City, Mexico

⁴Unidad de Investigación, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ), Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), México City, México

Correspondence

José Iván Sánchez Betancourt,
Departamento de Medicina y Zootecnia de Cerdos, FMVZ-UNAM, Mexico City, Mexico.
Email: aisb_7@yahoo.com.mx

Funding information

CONACyT, Grant/Award Number: 254244

Abstract

Porcine deltacoronavirus has caused great economic losses in the swine industry worldwide. In this study, we carried out the first detection, sequencing and characterization of this virus in Mexico. We analysed 885 rectal samples by multiplex RT-PCR to determine coinfections. In addition, the Spike gene was amplified, sequenced and analysed phylogenetically. We found 85 positive samples for porcine deltacoronavirus, representing 9.6% of the total samples, and we determined that the most frequent coinfection was with porcine epidemic diarrhoea virus (54.1%). Four sequences of Mexican isolates were most closely related to those of the United States. The antigenic regions and the glycosylation site of the strains obtained coincide with those previously reported. This relationship is probably related to the commercial exchange of pigs between the US and Mexico and the geographical proximity of these two countries.

KEYWORDS

Mexico, phylogenetic analysis, porcine deltacoronavirus, prevalence, spike gene

1 | INTRODUCTION

Porcine deltacoronavirus (PDCoV) is an emerging virus that was recently described. This viral disease together with Porcine epidemic diarrhoea (PED) have caused a significant economic impact due to the high mortality rate in piglets (Jung, Hu, & Saif, 2016; Zhang, 2016). PDCoV belongs to the recently classified subgenus *Buldecovirus* of the *Deltacoronavirus* genus (ICTV, 2018). The subfamily *Orthocoronavirinae* is divided into four genera, *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gammacoronavirus* and *Deltacoronavirus*. The first two genera originate in bats, while the third and fourth genera originate in birds (Woo et al., 2012). These viruses can affect several species of mammals and birds and cause various clinical conditions (neurological, digestive and respiratory) (Wang, Byrum, & Zhang, 2014).

Coronaviruses are unique within RNA viruses because their genome is particularly large (~27.5 to ~31 kb). These enveloped viruses,

with a single chain in the 5'-3' direction and a helical nucleocapsid, contain at least seven open reading frames (ORF), which code for four structural proteins (Masters, 2006; Sawicki, 2009). Coronaviruses received their name due to one of their surface proteins, which is spicule-shaped, giving the appearance of a crown. This so-called S or "Spike" protein is glycosylated and plays a fundamental role in the binding and entry of the virus into the cell (Masters, 2006). The genome organization of PDCoV is in the following order: 5' untranslated region (UTR), replicase (ORF 1ab), spike gene (S), envelope gene (E), membrane gene (M), nonstructural gene 6 (NS6), nucleocapsid gene (N), NS7 gene and 3' UTR. Particularly, PDCoV lacks ORF 3 and non-structural protein 1 (Lee & Lee, 2014; Woo et al., 2012; Zhang & Yoo, 2016).

In pigs, at least six coronaviruses are known to cause diseases. These belong to three of the four known genera. Within the *Alphacoronaviruses* are the transmissible gastroenteritis virus (TGEV), the porcine epidemic diarrhoea virus (PEDV), the porcine

respiratory coronavirus and the HKU2-related bat coronavirus, which were described in China in 2016 related to acute diarrhea in pigs (Zhou et al., 2018). In the *Betacoronavirus*, there is the porcine hemagglutinating encephalomyelitis virus, and finally, in the genus of the *Deltacoronaviruses*, there is the newly described porcine deltacoronavirus (PDCoV) (Chen et al., 2015; ICTV, 2018).

Porcine deltacoronavirus was detected for the first time in Hong Kong in samples collected in 2009. This study aimed to determine the variability of bat coronaviruses due to the importance that the *Coronaviridae* family has in Hong Kong since the presentation of acute respiratory diseases in humans. In this work, pigs did not present an apparent clinical sign; however, PDCoV was detected (Woo et al., 2012).

Subsequently, in early 2014, PDCoV was reported from the United States of America (USA) and Canada, and it caused heavy economic losses to the swine industry due to the presentation of a clinical enteric disease (Marthaler, Jiang, Collins, & Rossow, 2014; Song et al., 2015; Wang et al., 2014). The described infection was indistinguishable from that caused by PEDV or TGEV. However, the first reports in the USA mentioned that the mortality in piglets was lower (30%–40%) than that normally observed in outbreaks of PED (Marthaler, Raymond, et al., 2014; Wang et al., 2014).

Experimental studies in piglets show that the most frequent signs related to PDCoV are watery diarrhoea, vomiting and dehydration (Ma et al., 2015). The authors note that PDCoV infections are common in pigs and that coinfections are frequent, especially with the porcine epidemic diarrhoea virus and rotavirus C (Hu et al., 2015; Marthaler, Raymond, et al., 2014; Song et al., 2015). Likewise, some authors speculated that coinfections are likely to cause higher mortality rates (Song et al., 2015).

Despite the impact that the disease has had in several pig-producing countries, until this year, we did not know about its presence or the genetic characteristics of the virus in Mexico. The objective of this work was to identify the presence of this virus in Mexico and to analyse the genomic sequence of the S gene (Spike).

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Sample collection and RNA extraction

To monitor the prevalence and sequence properties of PDCoV in Mexico, 885 porcine rectal swabs were collected from five different regions of the country from 2014 to 2017. The sampling locations are shown in Figure 1. These samples were preserved at -70°C until use, later they were diluted 1:5 with 1X PBS (pH 7.4) and then centrifuged at 5,000 rpm for 15 min. Once the sample was centrifuged, the supernatant was collected and the total RNA was extracted using a commercial kit following the manufacturer's recommendations (kit QIAamp Viral RNA, Qiagen Cat. 52906). The resulting yield of RNA extracted was 60 μl at an average concentration of 7 ng/ μl .

2.2 | Nucleic acid detection

2.2.1 | Real time-PCR

RT-qPCR was carried out to address the frequency of PDCoV monoinfection and coinfection(s) with PEDV and TGEV. We used the VetMAX™ PEDV/TGEV/SDCoV kit (Applied Biosystems Cat. A33402) following the manufacturer's recommendations.

2.3 | Phylogenetic analysis

2.3.1 | Spike (S) protein gene amplification

To amplify the S gene, RNA from the samples that were positive by RT-qPCR, was reverse-transcribed (RT) using the reverse primer 5'CACTATGCTGACGCAGAAG3' and Superscript II (Invitrogen, San Diego, CA). The RT products were then used to perform PCR using primers specifically targeting the S gene of PDCoV (forward, 5'CAGAATGCAGAGAGCTCTAT3' and reverse, 5'CGTCAGACATAGTGAGTGT3') based on the sequence PDCoV/USA/Illinois121/2014 (GenBank accession no. KJ481931) using the

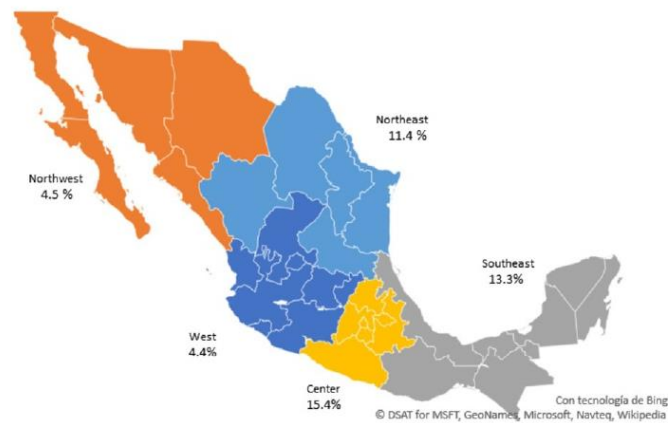


FIGURE 1 Regions of Mexico and percentage of PDCoV positives.

NCBI tool (National Center for Biotechnology Information) primer-BLAST. Amplification of fragments of 3,734 bp was obtained.

A high-fidelity polymerase was used in the PCR (LongAmp Hot Start Taq 2X Master Mix, Biolabs® cat #M05335) following the manufacturer's recommendations. The protocol was carried out in a LABNET Multigen Optimax thermocycler following denaturation at 94°C for 30 s; 35 cycles of 94°C × 15 s, 52°C alignment temperature for 30 s, and 65°C × 4 min; and a final extension of 65°C for 10 min.

2.4 | Sequencing

The cDNA obtained from the S gene amplification was subjected to sequencing using the Ion Personal Genome Machine platform (Ion Torrent Thermo Fisher Scientific) following the supplier's specifications for DNA sequencing. The obtained readings were filtered with the FastQC plug-in v3.4.1.1, selecting only those with a Q score ≥20 (6,074,916 reads); the obtained depth was greater than 300×.

2.5 | Alignment and phylogenetic analysis of the S gene (Tree Construction)

The alignment of the sequences obtained from the amplification of the S gene was performed using the Clustal W program in MEGA7 software (Kumar, Stecher, & Tamura, 2016). For the construction of the tree, the neighbour-joining distance-based method was used, and the bootstrap analysis consisted of 1,000 repetitions using the same software.

2.6 | Spike protein analysis

To predict the epitopes, the S protein was analysed with Protean, DNASTar V.7.1 (Madison, WI, EE. UU.). The Jameson-Wolf method predicted the potential antigenicity sites, which were compared with those reported by Mai, K and collaborators based on the sequence HKU15-155 (GenBank accession no. AFD29194.1). Likewise, the surface properties, including hydrophobicity, accessibility and flexibility, were analysed by the Kyte-Doolittle, Plot-Emini and Karplus-Schulz methods respectively also in Protean software. Furthermore, the positions of the epitopes were predicted using the online service <http://www.cbs.dtu.dk/services/BepiPred/>. The modelling of the amino acid sequence of the protein was carried out in

SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>). The glycosylation sites were analysed with NetNGlyc 1.0 server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc>).

3 | RESULTS AND DISCUSSION

PDCoV infections in Mexico have probably not been adequately addressed due to the high prevalence PED in the country since 2013. Pig farms have experienced sporadic outbreaks of diarrhoea in pigs less than 3 weeks old, often without determining the causative agent, while assuming that the causative agent is PEDV, possibly masking the presence of deltacoronavirus.

A total of 885 samples were analysed from five different regions of Mexico, of which 85 (9.6%) were PDCoV positive (Table 1, Figure 1). The most common coinfection was PDCoV/PEDV, found in 54.1% of the total deltacoronavirus-positive cases (46/85), a result that coincides with that reported by other authors (Song et al., 2015; Zhang, 2016). Coinfections with TGEV are the least frequent (10.6%; 9/85), while 16.5% (14/85) of the samples presented PDCoV as the only infectious agent. The central region presented the highest percentage of positive samples (15.4%; 38/246), followed by the south-eastern region (13.3%; 24/180), which are characterized by having highly productive pig farms (Table 1, Figure 1). In addition, it is interesting that a considerable number of samples (16/85) were positive for the three viral agents studied (PDCoV/PEDV/TGEV).

The S protein has the same structure in all coronaviruses. It is the most studied protein due to the role it plays in binding to the receptor and thus determining tropism, in addition to mediating the fusion of membranes for entry of the virus into the cell (Li et al., 2018; Shang et al., 2018). Within the coronaviruses, the genus *Deltacoronavirus* is the one with the smallest S protein; however, the structure is the same; it is divided into two subunits, S1 (1-573 aa) and S2 (574-1160 aa) (Thachil, Gerber, Xiao, Huang, & Opriessnig, 2015).

Four sequences of the complete S gene were obtained from three different regions, to which the following names were designated PDCoV Mex/Yuc 2015, PDCoV Mex/Oax 2017 (Southeast), PDCoV Mex/Edo Mex 2017 (Center) and PDCoV Mex/Qro 2017 (West). The S gene of the four Mexican sequences is composed of 3,480 nt and has a nucleotide identity between them of 99.4% on average. The highest identity was between the Edo Mex and Oax

TABLE 1 Presence and prevalence of infections of different pathogens in samples by region

Region	n	No. of positive samples		PDCoV (+/%)	PDCoV/PEDV (+/%)	PDCoV/TGEV (+/%)	PDCoV/PEDV/TGEV (+/%)
		n	% of positives				
Center	246	38	15.4	2/0.8	24/9.7	0	12/4.9
Southeast	180	24	13.3	6/3.3	10/5.5	6/3.3	2/1.1
Northeast	45	5	11.1	2/4.4	2/4.4	1/2.2	0
Northwest	48	2	4.2	0	0	1/2.1	1/2.1
West	366	16	4.4	4/1.1	10/2.7	1/0.3	1/0.3
Total	885	85	9.6	14/1.6	46/5.2	9/1.0	16/1.8

Abbreviations: PDCoV, porcine deltacoronavirus; PEDV, porcine epidemic diarrhoea virus; TGEV, transmissible gastroenteritis virus.

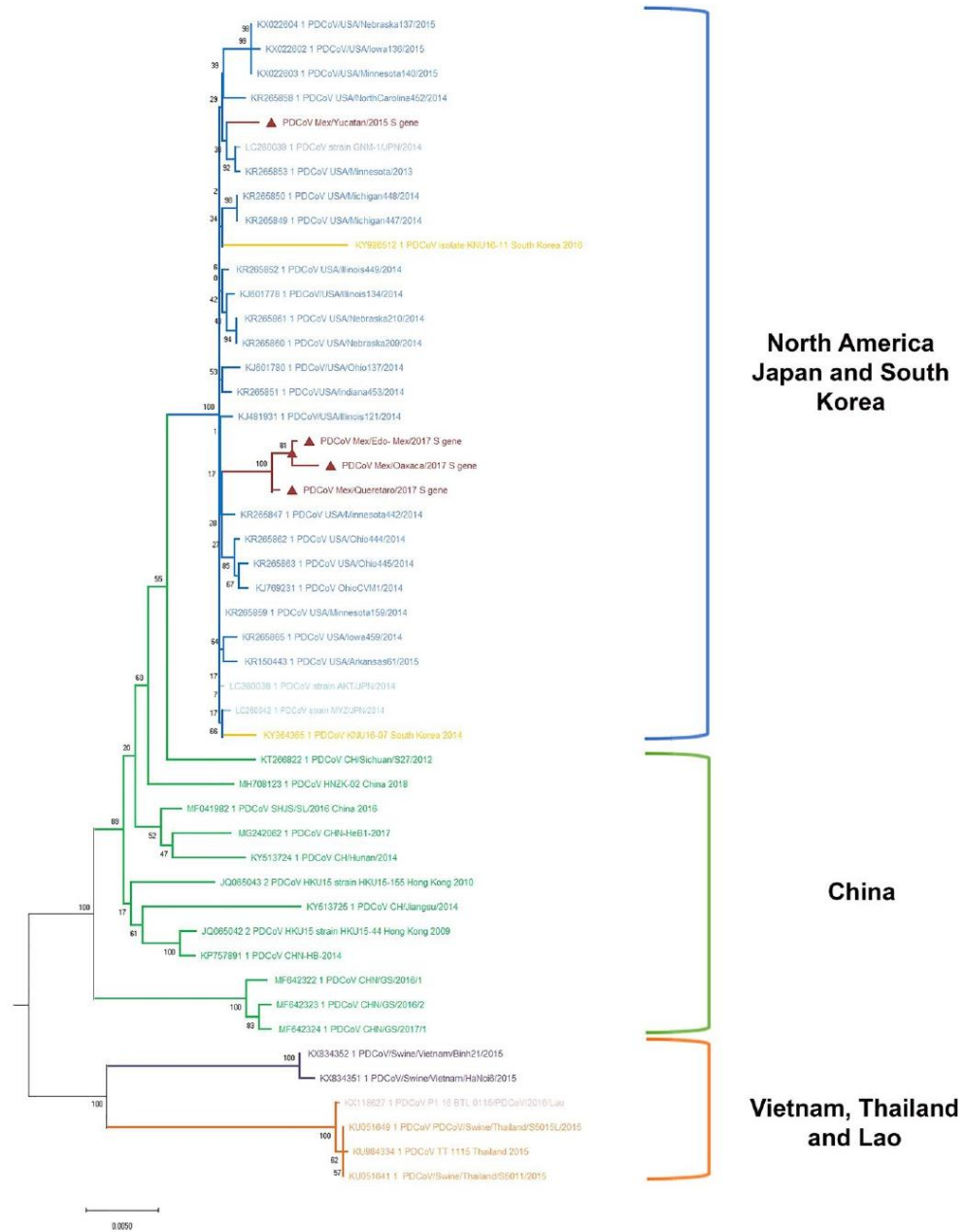


FIGURE 2 Phylogenetic analysis using the PDCoV spike protein (S) gene from 48 different strains. Each is represented by a different colour. Spike gene strains identified in this work are indicated with "red colour and triangle". The tree was constructed using MEGA 7.0 software with neighbour

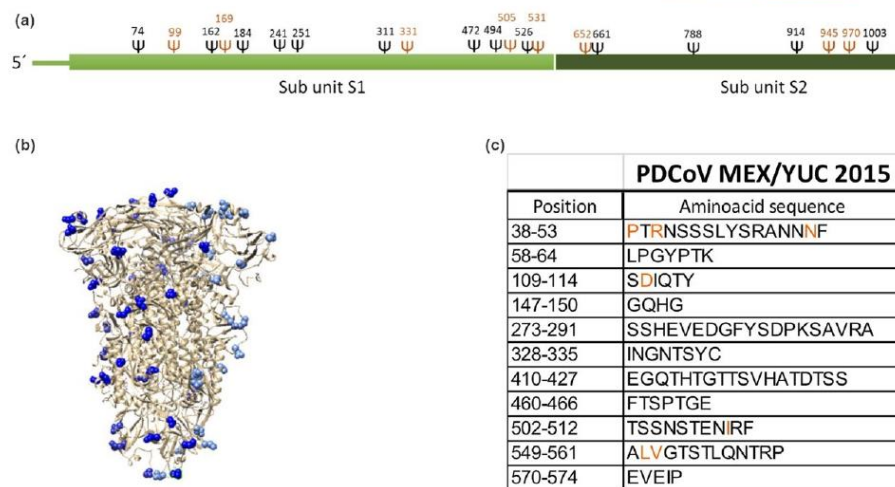


FIGURE 3 (a) Positions of the N-glycosylations predicted in PDCoV Mex/Yucatán 2015. Positions that coincide with those predicted by Shang, J. et al 2018 are in red, and positions observed by the same authors are in black. Ψ indicates N-linked glycosylate site. (b) N-glycosylation sites (blue) in the protein modelled as a trimer. (c) Position and sequence of the antigenic sites; the amino acids that are different with respect to the sequence HKU 15-155 are shown in red.

strains (99.8%) and the lowest identity value was between Yuc and Oax strains (99%). S gene sequences obtained from Mexican isolates shared 99.6% nucleotide identity with respect to North American strains. In addition, it presents a homology of 98%–98.7% with Chinese sequences and 96.5 and 96.1% with sequences from Vietnam and Thailand respectively.

A more detailed comparison analysis of Mexican strains was performed against the amino acid sequences of the S gene from the strains Illinois121/2014 (GenBank accession no. AHL45007) and Ohio137/2014 (GenBank accession no. ALB07807), which have structures known by electron microscopy (Shang et al., 2018; Xiong et al., 2018). We observed the mutation of amino acids at six sites (110 E/D, 221 N/K, 510 N/I, 534 K/N, 550 I/L, 624 A/V).

We built a phylogenetic tree using the neighbour-joining method with 48 sequences from all countries that are available in GenBank. Three main groups were formed. In the first group are sequences from China (in green, Figure 2) and in the second, sequences from Thailand, Laos and Vietnam are grouped (in orange). Finally, in the third group, we found sequences from the US, Japan and South Korea (in blue). This third group also comprises the sequences of the S gene from Mexico, which form two clades, one with sequences from 2017 and the second with the sequence from 2015. However, these clades are grouped closely with the strains from the United States.

Comparing the sequence of the 11 antigenic regions previously reported by Mai et al in 2017 against Mexican sequences, we found six mutations and one insertion in four of the 11 epitopes. We observed that at positions 38 to 53, a 1 amino acid insertion (N) increased the antigenic index, surface probability and hydrophilic level (Figure 3c and Figure S1) (Mai et al., 2018). Likewise,

17 glycosylations were located throughout the S1 region, similar those predicted by Xiaoli, X in 2018 to with the Illinois 2014 strain (Figure 3a). Knowing the glycosylation sites is important in the study of the antigenicity of the virus because the sites are part of a viral strategy to evade the host immune system (Shang et al., 2018). We know that the immune response of B cells is against the spike protein (Mai et al., 2018); however, deeper studies would be necessary to evaluate whether these predictions coincide with the real antigenicity and pathogenicity of the protein.

In conclusion, we determined that porcine deltacoronavirus occurs in Mexico and that it is frequently associated with other pathogens, mainly PEDV and TGEV. To date, recombinations of PDCoV with other coronaviruses have not been reported, but the recombinant capacity of these viruses is known, as demonstrated by the event reported in Italy, where porcine enteric coronavirus (SeCoV) was found. The genome of the S gene of this virus has greater homology with the PED virus, while the rest of its genome has homology with the TGE virus (Boniotti et al., 2016).

Likewise, the Mexican strain is phylogenetically closer to those strains reported in the US. This supports the theory of the current global distribution of porcine deltacoronavirus. Further analysis of the structure and changes found in the S protein of the PDCoV from Mexico are necessary to determine its degree of pathogenicity and antigenicity.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by CONACyT (Grant 254244). Mariana P is a doctoral student from the Programa de Doctorado en Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no financial or commercial conflicts of interest.

ORCID

Rene Segura-Velázquez  <https://orcid.org/0000-0001-8392-4919>

José Ivan Sánchez-Betancourt  <https://orcid.org/0000-0001-8201-9669>

Susana Mendoza-Elvira  <https://orcid.org/0000-0003-3672-6471>

REFERENCES

- Boniotti, M. B., Papetti, A., Lavazza, A., Alborali, G., Sozzi, E., Chiapponi, C., ... Marthaler, D. (2016). Porcine epidemic diarrhea virus and discovery of a recombinant swine enteric coronavirus, Italy. *Emerging Infectious Diseases*, 22(1), 83–87. <https://doi.org/10.3201/eid2201.150544>
- Chen, Q. I., Gauger, P., Stafne, M., Thomas, J., Arruda, P., Burrough, E., ... Zhang, J. (2015). Pathogenicity and pathogenesis of a United States porcine deltacoronavirus cell culture isolate in 5-day-old neonatal piglets. *Virology*, 482, 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.03.024>
- Hu, H., Jung, K., Vlasova, A. N., Chepngeno, J., Lu, Z., Wang, Q., & Saif, L. J. (2015). Isolation and characterization of porcine deltacoronavirus from pigs with diarrhea in the United States. *Journal of Clinical Microbiology*, 53(5), 1537–1548. <https://doi.org/10.1128/JCM.00031-15>
- ICTV. (2018). Virus taxonomy: 2018 release ICTV. Retrieved from https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/positive-sense-rna-viruses-2011/w/posrna_viruses/222/coronaviridae. Accessed November 6, 2018.
- Jung, K., Hu, H., & Saif, L. J. (2016). Porcine deltacoronavirus infection: Etiology, cell culture for virus isolation and propagation, molecular epidemiology and pathogenesis. *Virus Research*, 226, 50–59. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2016.04.009>
- Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA 7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33, 1870–1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
- Lee, S., & Lee, C. (2014). Complete genome characterization of Korean porcine deltacoronavirus strain KOR/KNU14-04/2014. *Genome Announcements*, 2(6), 4–5. <https://doi.org/10.1128/genomeA.01191-14>. Copyright
- Li, W., Hulswit, R. J. G., Kenney, S. P., Widjaja, I., Jung, K., Alhamo, M. A., ... Bosch, B.-J. (2018). Broad receptor engagement of an emerging global coronavirus may potentiate its diverse cross-species transmissibility. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(20), 1–9. <https://doi.org/10.1073/pnas.1802879115>
- Ma, Y., Zhang, Y., Liang, X., Lou, F., Oglesbee, M., Krakowka, S., & Li, J. (2015). Origin, evolution, and virulence of porcine deltacoronaviruses in the United States. *Microbiology*, 6(2), 1–13. <https://doi.org/10.1128/mBio.00064-15>. Invited
- Mai, K., Feng, J., Chen, G., Li, D., Zhou, L., Bai, Y., ... Ma, J. (2018). The detection and phylogenetic analysis of porcine deltacoronavirus from Guangdong Province in Southern China. *Transboundary and Emerging Diseases*, 65(1), 166–173. <https://doi.org/10.1111/tbed.12644>
- Marthaler, D., Jiang, Y., Collins, J., & Rossow, K. (2014). Porcine deltacoronavirus from the United States. *Genome Announcements*, 2(2), 2–3. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00218-14>. Copyright
- Marthaler, D., Raymond, L., Jiang, Y., Collins, J., Rossow, K., & Rovira, A. (2014). Rapid detection, complete genome, and phylogenetic analysis of porcine deltacoronavirus (Technical Appendix). *Emerging Infectious Diseases*, 20(8), 1347–1350. <https://doi.org/10.3201/eid2008.14-0526>
- Masters, P. S. (2006). The molecular biology of coronaviruses. *Advances in Virus Research*, 66, 193–292. [https://doi.org/10.1016/S0065-3527\(06\)66005-3](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(06)66005-3)
- Sawicki, S. G. (2009). Coronavirus genome replication. *Viral Genome Replication*, <https://doi.org/10.1007/b135974>
- Shang, J., Zheng, Y., Yang, Y., Liu, C., Geng, Q., Tai, W., ... Li, F. (2018). Cryo-electron microscopy structure of porcine deltacoronavirus spike protein in the prefusion state. *Journal of Virology*, 92(4), 1–14. <https://doi.org/10.1128/jvi.01556-17>
- Song, D., Zhou, X., Peng, Q., Chen, Y., Zhang, F., Huang, T., ... Tang, Y. (2015). Newly emerged porcine deltacoronavirus associated with diarrhoea in swine in China: Identification, prevalence and full-length genome sequence analysis. *Transboundary and Emerging Diseases*, 62(6), 575–580. <https://doi.org/10.1111/tbed.12399>
- Thachil, A., Gerber, P. F., Xiao, C. T., Huang, Y. W., & Opriessnig, T. (2015). Development and application of an ELISA for the detection of porcine deltacoronavirus IgG antibodies. *PLoS ONE*, 10(4), e0124363. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0124363>
- Wang, L., Byrum, B., & Zhang, Y. (2014). Detection and genetic characterization of deltacoronavirus in pigs, Ohio, USA, 2014. *Emerging Infectious Diseases*, 20(7), 1227–1230. <https://doi.org/10.3201/eid2007.140296>
- Woo, P. C. Y., Lau, S. K. P., Lam, C. S. F., Lau, C. C. Y., Tsang, A. K. L., Lau, J. H. N., ... Yuen, K.-Y. (2012). Discovery of seven novel mammalian and avian coronaviruses in the genus deltacoronavirus supports bat coronaviruses as the gene source of alphacoronavirus and betacoronavirus and avian coronaviruses as the gene source of gammacoronavirus and deltacoronavi. *Journal of Virology*, 86(7), 3995–4008. <https://doi.org/10.1128/JVI.06540-11>
- Xiong, X., Tortorici, A., Snijder, J., Yoshioka, C., Walls, A., Li, W., ... Veessier, D. (2018). Glycan shield and fusion activation of a deltacoronavirus spike glycoprotein fine-tuned for enteric infections. *Journal of Virology*, 92(4), 1–16. <https://doi.org/10.1128/JVI.01556-1>
- Zhang, J. (2016). Porcine deltacoronavirus: Overview of infection dynamics, diagnostic methods, prevalence and genetic evolution. *Virus Research*, 226, 71–84. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2016.05.028>
- Zhang, Q., & Yoo, D. (2016). Immune evasion of porcine enteric coronaviruses and viral modulation of antiviral innate signaling. *Virus Research*, 226, 128–141. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2016.05.015>
- Zhou, P., Fan, H., Lan, T., Yang, X.-L., Shi, W.-F., Zhang, W., ... Ma, J.-Y. (2018). Fatal swine acute diarrhoea syndrome caused by an HKU2-related coronavirus of bat origin. *Nature*, 556(7700), 255–259. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0010-9>

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of the article.

How to cite this article: Pérez-Rivera C, Ramírez-Mendoza H, Mendoza-Elvira S, Segura-Velázquez R, Sánchez-Betancourt JI. First report and phylogenetic analysis of porcine deltacoronavirus in Mexico. *Transbound Emerg Dis*. 2019;00:1–6. <https://doi.org/10.1111/tbed.13193>

